

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE P.O.A.

ROBSON MAIA FRANCO

***Escherichia coli*: OCORRÊNCIA EM SUÍNOS**
ABATIDOS NA GRANDE RIO E SUA VIABILIDADE
EXPERIMENTAL EM LINGÜIÇA FRESAL TIPO
TOSCANA

NITERÓI-RJ
2002

ROBSON MAIA FRANCO

Escherichia coli: OCORRÊNCIA EM SUÍNOS ABATIDOS NA GRANDE RIO E SUA
VIABILIDADE EXPERIMENTAL EM LINGÜIÇA FRESCAL TIPO TOSCANA

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 em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. Dr LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA

NITERÓI-.RJ
2002

ROBSON MAIA FRANCO

Escherichia coli: OCORRÊNCIA EM SUÍNOS ABATIDOS NA GRANDE RIO E SUA VIABILIDADE EXPERIMENTAL EM LINGÜIÇA FRESCAL TIPO TOSCANA

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 em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em 13 de dezembro de 2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr^a Maria da Graça Fichte do Nascimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa

Prof. Dr^a Máira Halfen Teixeira Liberal
Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro/Pesagro Rio

Prof. Dr. Wagner Luiz Moreira dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

NITERÓI-.RJ
2002

A Deus pela iluminação espiritual permanente na minha caminhada profícua terrena.

Aos meus pais Adão Linhares Franco e Stella Maia Franco por me propiciarem a oportunidade de mais uma etapa ilustre de experiência, trilhando-me por caminho salutar em toda minha existência.

Aos meus filhos Rosiane, Robson Junior e Rosana e à minha esposa Rosaura, companheiros de jornada e fontes fundamentais de amizade, amor e ao trabalho, luzes que iluminam os meus dias, fontes de inspiração.

Aos gênios das ciências e do humanismo por aguçarem os meus sentidos para a perseguição do conhecimento do desconhecido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira – meu orientador, pela amizade ao longo dos anos.

Ao Médico Veterinário José Carlos Albuquerque do Prado Carvalho – grande amigo, que me orgulho em ter lhe iniciado nos caminhos da microbiologia de alimentos.

À Prof^a Doutoranda Teresinha Ferreira – pelo companheirismo, incentivo e ajuda nos experimentos com antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – pela amizade, ajuda segura e competente, e confiar-me cientificamente.

Ao Prof. Dr. Teófilo José Pimentel da Silva – pela orientação no processamento tecnológico na produção laboratorial de embutidos.

À Prof^a Doutoranda Alice Gonçalves Martins Gonzales – pelo apoio nas análises em biologia molecular e PCR.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carmona de São Clemente – Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense pela cooperação na aquisição de material e equipamento técnico-científico, e por acreditar nas minhas atitudes profissionais.

Ao Prof. Ms Henrique Silva Pardi – Chefe do Departamento de Tecnologia dos Alimentos pela convivência, confiança e colaboração.

À Prof^a Dr^a Eliana de Fátima Marques de Mesquita – pela parceria científica e ajuda nos vernáculos da língua estrangeira.

Ao Alcinez Paes Fidelis – Técnico do Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, pela amizade e ajuda técnica laboratorial.

Ao Drausio Ferreira de Paiva – Secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela consideração e apoio nas solicitações.

Ao Luiz Gustavo da Silva Soares – Chefe de Secretaria do Departamento de Tecnologia dos Alimentos, pelo convívio e préstimos atendidos.

A simplicidade é o que há de mais difícil no mundo: é o extremo da experiência e o último fruto do gênio, portanto, é o último degrau da sabedoria.....

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”. (Isaac Newton)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 9

LISTA DE TABELAS, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 12

RESUMO, p. 15

ABSTRACT, p. 16

1 INTRODUÇÃO, p. 17

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 22

2.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DA *Escherichia coli*, p. 22

2.2 SINDROMES GASTROENTÉRICAS POR *Escherichia coli*, p. 24

2.3 RISCOS DE INFECÇÃO POR *Escherichia coli*, p. 27

2.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE POR CEPAS DE *Escherichia coli*, p. 29

2.5 EPIDEMIOLOGIA, p. 35

2.6 PORTADORES HUMANOS DE *Escherichia coli*, p. 37

2.7 *Escherichia coli* NO AMBIENTE, p. 38

2.8 ALIMENTOS CÁRNEOS ENVOLVIDOS NA CONTAMINAÇÃO POR *Escherichia coli*, p. 39

2.9 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* EM ALIMENTOS, p. 45

2.10 MÉTODOS ANALÍTICOS LABORATORIAIS, CONVENCIONAIS, PARA O ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE *Escherichia coli*, p. 48

2.11 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, p. 54

2.12 ESTRATÉGIAS PARA PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES POR *Escherichia coli*, p. 58

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 65

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS, p. 65

3.2 MATERIAL E MÉTODOS, p. 65

3.2.1 Material, p. 65

3.2.1.1 Amostras, p. 65

3.2.2 Métodos, p. 66

3.2.2.1 Controle de qualidade dos meios de cultura, p. 66

3.2.2.2 Obtenção e preparo das subamostras em laboratório, p. 67

3.2.2.3 Análises Bacteriológicas, p. 67

3.2.2.3.1 *Enumeração de coliformes (Hitchins et al., 1995; Kornacki & Johnson, 2001) – Método 1*, p. 68

A- Teste presuntivo, p. 68

B- Teste confirmativo, p. 69

C- Teste completo, p. 69

3.2.2.3.2 *Seleção dos cultivos e identificação dos ilomentos de Escherichia coli e sorotipagem*, p. 69

3.2.2.3.3 *Enumeração de coliformes fecais (Hitchins et al., 1995; Kornacki & Johnson, 2001) – Método 1*, p. 72

3.2.2.3.4 *Método Simplate™ para coliformes totais e Escherichia coli (Townsend et al.,*

- 1996) – Método 2, p. 73
- 3.2.2.3.5 Isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7 (Merck, 1996) – Método 3, p. 75
- 3.2.2.3.6 Pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica (Mehlman & Lovett, 1984c) com modificações – Método 4, p. 76
- A- Preparo do inóculo e enriquecimento não seletivo, p. 76
- B- Semeadura direta, p. 77
- C- Enriquecimento para isolar *Escherichia coli* enteropatogênica, p. 77
- D- Semeadura após enriquecimento, p. 77
- E- Seleção das colônias de *Escherichia coli*, p. 78
- F- Identificação de *Escherichia coli*, p. 78
- G- Manutenção das colônias de *Escherichia coli* e sorotipagem foram procedidas segundo 3.2.2.3.2., p. 79
- 3.2.2.3.7 Teste de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) Multiplex, p. 79
- 3.2.2.3.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos, p. 80
- 3.2.2.3.9 Verificação da viabilidade, experimental, das cepas de *Escherichia coli* patogênicas isoladas, em lingüiça suína frescal tipo toscana, p. 80
- 3.2.2.3.10 Análise estatística dos resultados, p. 82

4 RESULTADOS, p. 83

- 4.1 ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES, COLIFORMES FECAIS E *Escherichia coli* – MÉTODOS 1 e 2, p. 83
- 4.1.1 Região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria, p. 83
- 4.1.2 Cavidade torácica ente 4^a e 7^a costelas (pleura e músculos intercostais), p. 84
- 4.1.3 Cavidade pélvica (Região sub-sacral próxima à base da cauda), p.84
- 4.2 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC) E *Escherichia coli* O157:H7 – MÉTODO 3, p. 84
- 4.3 PESQUISA DE COLÔNIAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (Mehlman & Lovet, 1984c) MODIFICADO – MÉTODO 4, p. 85
- 4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 87
- 4.5 SOROLOGIA E TESTE DE “POLYMERASE CHAIN REACTION” (PCR), p. 87
- 4.6 VIABILIDADE EXPERIMENTAL, p. 88

5 DISCUSSÃO, p. 89

6 CONCLUSÕES, p. 105

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 107

8 APÊNDICES, p. 135

9 ANEXOS, p. 151

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Pontos de obtenção de amostra	150
	 Área correspondente à área de ferida de sangria	
	 Cavidade torácica entre 4ª e 7º costelas	
	 Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)	
Figura 2	Ponto de obtenção de amostras	151
	 Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)	
Figura 3	Meio caldo lauril sulfato usado no enriquecimento do método 3	152
Figura 4	Meio caldo BHI usado no enriquecimento do método 4	152
Figura 5	Meio caldo triptona fosfato-2N usado no enriquecimento para EPEC	152
Figura 6	Meio de enriquecimento do método 3 e placas contendo cultivo para confecção de suspensões padrões e placas para avaliação de sensibilidade antimicrobiana	153
Figura 7	Meio de plaqueamento ágar MacConkey lactose contendo colônias características de <i>Escherichia coli</i>	153
Figura 8	Meio de plaqueamento ágar EMB com colônias características de <i>Escherichia coli</i>	153
Figura 9	Meio de plaqueamento ágar MacConkey sorbitol com colônias características de <i>Escherichia coli</i>	153
Figura 10	Meio ágar TC-SMAC sem crescimento	154
Figura 11	Meio ágar <i>Escherichia coli</i> O157:H7 fluorocult com colônias características de <i>Escherichia coli</i>	154
Figura 12	Meio HC com colônias características de <i>Escherichia coli</i>	154
Figura 13	Meio HC com colônias características (púrpuras) e não caracterizadas (amarelas) de <i>Escherichia coli</i>	154
Figura 14	Meio EPM com indicação de comportamento característico de <i>Escherichia coli</i>	155
Figura 15	Meio MILI com indicação de comportamento característico de <i>Escherichia coli</i>	155
Figura 16	Meio MILI com indicação de comportamento característico de	

<i>Escherichia coli</i> com adição do reativo de Kovac's (prova do indol)	155
Figura 17 Meios: O/F celubiose, ornitina descarboxilase e TSI com indicação característica de <i>Escherichia coli</i>	155
Figura 18 Meios: ágar SIM, citrato, MR-VP, O/F sorbitol, O/F manitol não inoculados e com cultivo de <i>Escherichia coli</i> , respectivamente	155
Figura 19 Meios: MILI e SIM com indicação característica de <i>Escherichia coli</i>	155
Figura 20 Meio SIM: sem inóculo; H ₂ S (-), indol (+), H ₂ S (+) e crescimento característico de cepa padrão	155
Figura 21 Meio simplate – coliformes totais (cor púrpura)	156
Figura 22 Meio simplate – coliformes totais (cor púrpura), <i>Escherichia coli</i> (cor azul fluorescente)	156
Figura 23 Placas de ágar Mueller Hinton evidenciando halos de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos	157
Figura 24 Embutido (Lingüiça Suína Frescal Tipo Toscana “LSFT”) produzido no Laboratório de Tecnologia de Carnes, pronto para inoculação de <i>Escherichia coli</i>	157
Figura 25 Embutido (LSFT) inoculado com <i>Escherichia coli</i> e embalado separadamente para verificação da viabilidade bacteriana	157
Figura 26 Embutido (LSFT) após o período de armazenamento a 4°C para verificação da viabilidade	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– Resultados das análises do NMP pelos métodos 1 e 2 das amostras oriundas da região interna da papada correspondente à área da ferida de sangria (FS); da região da cavidade torácica entre a 4ª e a 7ª constelas (pleura e músculos intercostais) (CT); e da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda (CP)	141
TABELA 2 – Desvio padrão, mediana, coeficiente de variação e média dos NMP das bactérias por tratamento, baseados nos dados da tabela 1	142
TABELA 3 – Número de UFC de <i>Escherichia coli</i> (EPEC e EHEC) isoladas de amostras suínas pelo Método 3	142
TABELA 4 – Número de UFC de <i>Escherichia coli</i> isoladas em meios por plaqueamento direto (1) e por enriquecimento (2) no Método 4	143
TABELA 5 – Ocorrência de sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> em amostras suínas por região de obtenção	144
TABELA 6 – Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> considerados patogênicos isolados de meios de cultura seletivos indicadores	144
TABELA 7 – Ocorrência de sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> identificados nos diferentes métodos analíticos bacteriológicos aplicados	145
TABELA 8 – Eficiência dos diferentes tipos de meios empregados no método 4 (semeadura direta e enriquecimento) nos diferentes tipos de amostras para isolamento de <i>Escherichia coli</i>	146
TABELA 9 – Isolamento de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora, enterohemorrágica provenientes de amostras de origem suína	147
TABELA 10 – Comportamento das 17 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos	147
TABELA 11 – Comportamento de três cepas de <i>Escherichia coli</i> (Tipo I) não patogênicas isoladas dos diferentes locais de colheita: ferida de sangria, cavidade torácica, cavidade pélvica, linfonodos e fezes frente aos antimicrobianos	148
TABELA 12 – Índice de NMP e limites de confiança de 95% para estimar testes em tubos de fermentação pela inoculação de cinco tubos com 0,1g, 0,01g e 0,001g	158
TABELA 13 – Número Mais Provável (NMP) para contagem normal pelo método SIMPLATE	159

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/E	Attachment/Efforcement
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
Art.	Artigo
ATCC	American Type Culture Collection
Bfp	Bundle forming pilus
BGN	Bastonete Gran Negativo
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control
CLS	Caldo Lauril Sulfato
CPHL-UK	Center Public Health Laboratory – United Kington
CPR	Clorophenol Red
CPRG	Clorophenol- β -D-galactopiranosideo
CTI	Comitês Técnicos Intersetoriais
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>
DST	Defined Substrate Technology
DTA	Doenças Transmissíveis por Alimentos
eae	<i>Escherichia coli</i> <u>att</u> aching and <u>eff</u> acing
eaf	<u>EPEC</u> <u>a</u> dherence <u>f</u> actor
EaggEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América

FEEC	Facultative enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GD1	Gangliosidic Disialo
GM1	Gangliosidic Monosialo
g	Gram
h	hora
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ICMSF	International Commission on Microbiological Specification for Foods
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<i>inv</i>	Invasion
IPA	Invasion Plasmid Antigen
LT	Labile Toxin
MAARA	Ministério da Agricultura Abastecimento e Reforma Agrária
MILI	Mobilidade Indol Lisina
MR	Metil Red
MUG	Metil Umbeliferil Galactopiranosídeo
NACMCF	National Advisory Committe on Microbiological Criteria for Foods
nº	Número
NAS	National Academy of Sciences
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCIB	National Collection of Industrial Bactéria
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
NMP	Número Mais Provável
pb	Pares de bases

PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>per</i>	Plasmid encoded regulator
PHLS	Public Health Laboratory Science
POA	Produtos de Origem Animal
PPHO	Procedimentos Padrões de Higiene Operacional
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SDA	Secretaria da Defesa Agropecuária
SFT	Solução Fosfatada Tamponada
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Sulfêto Indol Motilidade
SLT	Shiga Like Toxin
ST	Stabile Termic
TDCL	Toxina Dilatadora Citoletal
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
USDA	United State Departament of Agriculture
VBBL	Verde Brilhante Bile Lactose
VP	Voges Proskauer
VT	Verotoxina
°C	Grau Celsius
%	Por cento

RESUMO

No mundo inteiro, ultimamente tem ocorrido surtos de doenças transmissíveis por alimentos tendo como agente etiológico cepas de *Escherichia coli*, colocando em alerta o serviço de vigilância sanitária de alimentos e a comunidade científica, havendo necessidade de suporte para inspeção sanitária de métodos de análises bacteriológicas em produtos de origem animal, para diagnóstico completo e definitivo. Após a reflexão da importância que a *E. coli* vem ocupando na higiene de produtos de origem animal, na análise de perigos e pontos críticos de controle e no controle de qualidade bacteriológica desses produtos, foi desenvolvida pesquisa com objetivo de enumerar, isolar e identificar sorogrupos de *E. coli* em 100 amostras de suínos abatidos no Grande Rio. Sendo 20 amostras de ferida de sangria, 20 de pleura e músculos intercostais, 20 da cavidade pélvica, 20 de linfonodos mesentéricos e 20 de fezes da região íleo-ceco-cólica, mediante aplicação de quatro metodologias diferentes. Os sorogrupos presentes foram analisados frente à técnica de reação de polimerase em cadeia, teste de sensibilidade aos antimicrobianos e verificação da viabilidade experimental das cepas de *E. coli* patogênicas, em lingüiça suína frescal tipo toscana. Entre os tipos de amostras comestíveis analisadas, aquelas que apresentaram menor enumeração de *E. coli* foram as da cavidade torácica, enquanto que as da cavidade pélvica apresentaram maior enumeração do microrganismo. O maior número colônias isoladas foi nas amostras de fezes. O método que possibilitou o isolamento de maior número de colônias foi o de Mehlman e Lovett (1984c) modificado. Foram isolados sorogrupos EPEC, EIEC e EHEC. A reação de polimerase em cadeia demonstrou a presença de cepa O157:H. As dezessete cepas patogênicas isoladas e testadas apresentaram sensibilidade a dois antibióticos e resistência a sete. A análise estatística foi determinada pela média e variações entre as médias usando intervalo de confiança de 95% (5% de erro). Todas as cepas isoladas e identificadas pelos métodos convencionais utilizados, foram bioquimicamente confirmadas no sistema API-20E. Os sorogrupos isolados apresentaram viabilidade em lingüiça suína frescal tipo toscana, foram recuperados e identificados com o mesmo perfil bioquímico do primeiro isolamento. A presença dos sorogrupos de *E. coli* nas amostras comestíveis, ressalta a necessidade de se colocar em prática o sistema nacional e internacional da inocuidade de produtos de origem animal, para que a carne suína não seja veiculadora de enfermidades transmissíveis por alimentos, tendo como agente etiológico sorogrupos patogênicos ou oportunistas de *E. coli*, e que através de dejetos industriais, não tratados, estas cepas, inclusive O157:H⁻, não seja inserida na cadeia alimentar.

Palavras-chave. Antibióticos, embutidos, métodos.

ABSTRACT

Recently, throughout the world, there have been outbreaks of diseases transmissible through food, whose etiological agents are variants of *E. coli*, putting food safety services and the scientific community on alert, with the consequent need for support for the sanitary inspection of the methods of bacteriological analysis in products of animal origin, for complete and definitive diagnosis. After much reflection on the importance of *E. coli* in the hygiene of products of animal origin, in the analysis of dangers and of critical control points, and in the control of the bacteriological quality of these products, research was developed with the objective of enumerating, isolating and identifying serum-groups of *E. coli* in 100 samples taken from swine slaughtered in Greater Rio. These included 20 samples from bleeding wounds, 20 from pleura and intercostal muscles, 20 from the pelvic cavity, 20 from the mesenteric lymph nodes and 20 from faeces in the ileocaecal-colic region, with the application of four different types of methodology. The serum groups present were analysed using the polymerise chain reaction technique, the anti-microbial sensitivity test, and the verification of the experimental viability of the variants of *E. coli* pathogens in 'Tuscany type' fresh pork sausage. Among the types of edible samples analysed, those which had the lowest enumeration of *E. coli* were from the thoracic cavity, whilst those from the pelvic cavity presented the highest enumeration of the microorganism. The highest number of colony isolated was in the samples from the faeces. The method which allowed the isolation of the highest number of colony was that of Mehlman and Lovett (1984c), modified. The serum groups EPEC, EIEC and EHEC were isolated. The polymerise chain reaction technique showed the presence of variant O157:H-. The seventeen pathogen variants isolated and tested presented sensitivity to two antibiotics and resistance to seven. The statistical analysis was determined by the averages and variations between them, using a confidence level of 95% (5% error rate). All the variants isolated and identified by the conventional methods used were biochemically confirmed in the API-20E system. The isolated serum groups which had presented viability in the 'Tuscany type' fresh pork sausage were recovered and identified with the same biochemical profile as in the original isolation. The presence of serum groups of *E. coli* in the edible samples highlights the need to put into practice the national and international system of the inoculation of products of animal origin, so that pork will not be a transmitter of illness transmissible through food, having as an etiological agent serum groups, whether pathogen or opportunistic, of *E. coli*, and that through non-treated industrial waste these variants, including O157:H-, do not become inserted into the food chain.

Key-words. Antibiotics, sausage, methods.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira desempenha importante função em todos os setores da economia nacional gerando empregos, intensificando a demanda de insumos agropecuários, na industrialização e na comercialização de produtos de origem animal; obtendo divisas ao exportar carnes e se constitui numa excelente fonte de proteína animal.

A imposição de um único padrão de fiscalização sanitária para todo o país, alterando a Lei nº 7889/89, o não financiamento aos Matadouros Municipais, o fechamento dos abatedouros clandestinos, a implantação da Portaria nº 304 (Brasil, 1996), impondo melhorias nas condições sanitárias, são medidas que visam melhorar a qualidade da carne suína brasileira, pois sua exportação tem apresentado volume acumulado de 18.000 toneladas, com valor de US\$ 36.111,00, com preço médio de US\$ 1.912,00/tonelada, cujo consumo “per capita”, no Brasil, vem aumentando progressivamente, com uma previsão em torno de 9,0Kg. A Portaria 304 (Brasil, 1996), determina que a embalagem da carne bovina e suína oriunda de frigoríficos, deverá conter o máximo de informações sobre a origem das carnes apresentadas em cortes padronizados, em vigor desde 15 de agosto de 1996, visando manter a qualidade sanitária e combater o abate clandestino.

A campanha publicitária da carne suína através do Fundo de Promoção e Divulgação da Carne Suína e seus Derivados, objetiva aumentar o consumo “per capita” brasileiro e afastar o preconceito contra a carne suína, prevendo em três anos aumentar o consumo de 9Kg “per capita” para 12Kg. A produção de carne suína no Brasil está em torno de 1.620 toneladas, com uma produção mundial estimada em 83.500 toneladas e segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, hoje a carne suína aqui produzida tem 31% a menos de gordura, 175% a menos de calorias e 10% a menos de colesterol.

A carne suína e seus produtos derivados, sofrem contaminações e possíveis alterações bacterianas em função de fatores intrínsecos e extrínsecos tais como: sanidade animal, criação zootécnica (raça, tipo de manejo, alimentação, prevenção de doenças pelo uso adequado de vacinas); pH, potencial de oxi-redução e umidade da própria carne. Estes fatores podem determinar contaminações cruzadas, resultando em carnes com elevada carga bacteriana e possível contaminação de origem fecal, onde a *Escherichia coli* se destaca no cenário nacional e internacional como um microrganismo de importância em sanidade animal, higiênico-sanitária e saúde pública.

Os padrões microbiológicos de identidade e qualidade vigentes, nacionais e internacionais, objetivam razões estéticas, econômicas e de saúde pública, e são importantes pois permitem melhor racionalização e uniformização de análises e resultados microbiológicos.

Às indústrias compete a proteção dos alimentos dentro dos padrões e condições previstas na Legislação específica, cabendo à Inspeção a observância no atendimento aos preceitos técnicos e higiênico sanitários. Desta forma, os interesses das indústrias e da Inspeção são convergentes, motivo pelo qual necessita-se de um amplo entrosamento entre esses dois segmentos; do mesmo modo, o Serviço de Vigilância Sanitária deverá atuar ao nível de comércio, assegurando as condições originais do produto no momento de sua comercialização (Oliveira, 1984).

Na qualidade e inocuidade microbiológica de alimentos deseja-se a isenção de microrganismos infecciosos, embora não seja possível conseguir uma tolerância zero para todos os microrganismos com os procedimentos corretos de fabricação. Entretanto, a produção de alimentos com o menor número de microrganismos é o objetivo desejável, para ter-se a salubridade (Jay, 1994).

Os microrganismos indicadores da qualidade microbiológica ou vida útil dos alimentos são microrganismos e/ou seus produtos metabólicos cuja presença em quantidades determinadas podem avaliar a qualidade existente ou prever a vida útil dos alimentos e, para Jay (1994), cumprem os seguintes critérios: devem estar presentes e ser detectados em todos os alimentos cuja qualidade ou a falta da mesma se deve avaliar; sua multiplicação e seu número devem ter uma relação direta negativa com a qualidade do alimento; devem ser detectados e contados facilmente e diferenciados de outros microrganismos; ser contados numa jornada de trabalho; seu crescimento não deve ser obstaculizado por outros componentes da microbiota do alimento; terem associação

constante com o patogênico que deve indicar; terem uma taxa de morte que ao menos seja paralela ao do patogênico; e que, resistam por algum tempo a mais que o patogênico de interesse; não existirem nos alimentos que estão isentos do patogênico, exceto talvez em quantidades mínimas.

Esses critérios se aplicam à maioria dos alimentos, que podem veicular patogênicos de origem alimentar, independentemente de sua procedência para os alimentos. No uso histórico dos indicadores da inocuidade, supõem-se que os patogênicos de interesse sejam microrganismos de origem intestinal que ocasionavam contaminação fecal direta ou indireta. Sendo estes usados em tempos passados para detectar a contaminação fecal das águas e como elo a possível presença de patogênicos intestinais. O primeiro indicador de contaminação fecal foi a *Escherichia coli*. O conceito de indicadores fecais aplicado à inocuidade dos alimentos, inicialmente foi proposto por Buteaux & Mossel (1961), sugerindo que as bactérias escolhidas devem: demonstrar especificidades, existindo unicamente nos meios intestinais; existir em quantidades muito elevadas nas fezes de modo a serem encontradas em altas diluições; estar dotadas de elevada resistência extra intestinal, cuja contaminação deve ser elevada; permitir a detecção relativamente fácil e confiável, inclusive quando presentes em quantidades muito pequenas.

O significado da presença de *Escherichia coli* em alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos. Inicialmente, por ser uma enterobactéria, quando detectada no alimento, indica que esse alimento tem uma contaminação bacteriana de origem fecal e portanto está em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. O outro prisma a ser considerado é que diversas cepas de *Escherichia coli* são comprovadamente patogênicas para o Homem (Levine, 1987), e para os animais (Bettelheim, 2002).

Os estabelecimentos de abate com vistas ao programa de redução de microrganismos patogênicos estão implementando os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO), específicos para cada indústria, para assegurar o cumprimento em manter limpos suas instalações e equipamentos. A Portaria nº 1428 de 26 de Novembro de 1993 do Ministério da Saúde, no Artigo 1º, aprova o “Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos”, as “Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos”, e o “Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos (Brasil, 1993d).

Os PPHO têm servido de base , desde 1991, para a implantação, do Sistema de Prevenção e Controle com base na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), regulamentado pela Portaria nº 23, de 12 de Fevereiro de 1993, da Secretaria Executiva do MAARA e pelas Portarias nº 11, de 18 de Fevereiro de 1993, nº13 de 13 de Março de 1993 e Circular nº 245/96 da Secretaria de Defesa Agropecuária (Brasil, 1993a; Brasil, 1993b; Brasil, 1993c; Brasil, 1996).

O regulamento final do “Food Safety and Inspection Service” (FSIS), do “United State Department of Agriculture (USDA), estabeleceu novas exigências para todos os estabelecimentos brasileiros interessados em permanecer na lista dos habilitados a exportar produtos a base de carne para os Estados Unidos, com o intuito de melhorar a segurança dos alimentos e modernizar o sistema de inspeção de carnes (Federal Register, 1996).

Esta nova legislação está embasada no Programa de Redução de Patógenos e Implantação do Sistema de APPCC onde todos os matadouros e fábricas de processamento de carnes serão obrigados a adotar um sistema de controle de processos, para prevenir riscos à segurança alimentar, conhecido internacionalmente como “Hazard Analysis and Critical Control Points” (HACCP). Para verificar se o sistema “HACCP” (APPCC) é efetivo na redução dos contaminações por patógenos, o FSIS está estabelecendo padrões de desempenho de redução de patógenos que os estabelecimentos de abate e as fábricas que elaboram produtos cárneos devem atender.

Além disso, os estabelecimentos de abate serão obrigados a realizar análises microbiológicas para *Escherichia coli*, a fim de verificar se seus sistemas de controle de processos estão funcionando como planejado, para prevenir contaminação fecal, via principal de contaminação por bactérias patogênicas.

O FSIS também exige que as fábricas adotem e sigam os PPHO, para reduzir a possibilidade de que os patógenos contaminem o produto acabado, e espera que a combinação dos processos de controle tipo HACCP, das análises microbiológicas, dos padrões de desempenho para redução de patógenos e dos procedimentos operacionais de higienização reduzam, significativamente, a contaminação dos produtos cárneos por patógenos, diminuindo os riscos de enfermidades de origem alimentar.

O controle de processos do “HACCP”, para ser efetivo, deve ser combinado com meios efetivos para verificar se as indústrias de carne estão atingindo níveis aceitáveis de desempenho de segurança alimentar. O FSIS exige que todos os estabelecimentos de abate realizem análises para verificar a presença de *Escherichia coli*, espécie do grupo coliforme

que é encontrada no trato intestinal dos animais e indicadora de contaminação fecal, sendo considerada como a via primária de contaminação de carnes, por categorias patogênicas da espécie e outros microrganismos emergentes (*Campylobacter spp*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp*) que podem ocasionar doenças. O FSIS estima que a contaminação de carnes por estas bactérias ocasionem, anualmente, cerca de 4.000 mortes e 5.000.000 de doentes. Entretanto a Legislação Nacional, Resolução nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001), não menciona padrão bacteriológico para coliformes em carne suína.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DA *Escherichia coli*

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Fontes de carbono como acetato e glicose são usados para crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. A glicose é fermentada a ácidos: láctico, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. Acetoína ou acetil metil carbinol não são formados. Conseqüentemente, *E. coli* produz β -galactosidase e indol mas não forma sulfeto de hidrogênio ou hidrolisa a uréia (Brenner, 1984; Orskov, 1984; Acha & Szyfres, 2001; Bettelheim, 2002). Lautrop *et al.* (1971) e Layne *et al.* (1971) relatam a ocorrência de cepas de H_2S *E. coli* positivas, cujo comportamento fenotípico é mediado por plasmídio.

Esta espécie pertence ao grupo de coliformes fecais, sendo descrita pela primeira vez por Dr Theodor Escherich em 1885 ao tentar isolar o agente etiológico da cólera (Escherich, 1889; Adam & Moss, 1997)

Os coliformes fecais são caracterizados por produzirem ácido e gás em caldo EC em temperaturas compreendidas entre 44°C e 46°C, habitualmente 44,5°C ou 45,5°C em caldo EC para *Escherichia coli* idealizado em 1942 por Perry & Hajna (1944). Kornacki & Johnson (2001) consideram que o termo “coliformes termo-tolerantes” é usado algumas vezes para referir-se a estes organismos e seja talvez mais adequado que “coliformes fecais”. A utilização das provas bioquímicas denominadas IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato) são capazes de indicar a presença de *Escherichia coli* através das reações (+, +, -, -) para o tipo I e (-, +, -, -) para o tipo II. Entretanto,

ressalta-se que este perfil pode ser encontrado em outras cepas do gênero, além disso nem todas as cepas enteropatogênicas e as cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* (EHEC) não crescem à 44,5°C na formulação convencional do meio EC, porém crescem quando a percentagem de sais biliares do meio se reduz de 0,15% a 0,112% (Szabo *et al.*, 1986; Hitchins *et al.*, 1992; Bourgeois *et al.*, 1994).

A *Escherichia coli* é a espécie comensal predominante na microbiota anaeróbica facultativa do trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente (Drasar & Hill, 1974) A habilidade para distinguir cepas de *Escherichia coli* sorologicamente é importante em esclarecer as pesquisas, mostrando que certos tipos de *Escherichia coli* causam diarreia de verão ou diarreia infantil. A sorologia é baseada em diferentes antígenos encontrados em estrutura da superfície bacteriana. Os três antígenos fundamentais são O,K,H (Orskov & Orskov, 1984; Meng *et al.*, 2001; Bettelheim, 2002). Os antígenos somáticos “O” termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares “H” termolábeis, relacionados com proteínas dos flagelos, e antígenos capsulares “K” termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Foram descritos, até o momento, 173 antígenos O, 56 H e 100 K diferentes (Franco & Landgraf, 1996; Acha & Szyfres, 2001; Meng *et al.*, 2001). Comensal intestinal dos animais homeotérmicos, considerada um importante patógeno intestinal e patógeno oportunista quando em outros "habitats" (Krieg & Holt, 1984; Holt *et al.*, 1994).

As cepas de *Escherichia coli* que produzem gastroenterites em crianças, adultos e animais são denominadas enteropatogênicas, podendo-se distinguir categorias: enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) (Levine, 1987; Jay, 1994; Hitchins *et al.*, 1995 (Revision A/1998); Trabulsi *et al.*, 1996; Varnam & Evans, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Silva *et al.*, 1997; Harrigan, 1998; Hobbs & Robert, 1999; CDC, 2000b; Meng *et al.*, 2001), facultativamente enteropatogênica (FEEC) (Jay, 1994; Franco & Landgraf, 1996), enteroagregativa (EAaggEC) (Hitchins *et al.*, 1995 (Revision A, 1998); Trabulsi *et al.*, 1996; Franco & Landgraf, 1996; Varnam & Evans, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Harrigan, 1998; CDC, 2000b; Meng *et al.*, 2001), difusivamente aderente (DAEC) (Trabulsi *et al.*, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Harrigan, 1998; CDC, 2000b; Meng *et al.*, 2001), uropatogênica (UPEC), neo natal meningite (NMEC) (Adam & Moss, 1997) com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia.

Os primeiros estudos sobre diarreia relacionada com *Escherichia coli* foram os realizados por ocasião de uma epidemia que ocorreu em uma creche aos meados da década de 1940 que produziu um índice de mortalidade da ordem de 50%. Em meados da década dos anos de 1950, comprovaram-se que alguns isolamentos produziam respostas na prova de alça intestinal de coelho parecidas com as que produzia o *Vibrio cholerae*. Estes achados conduziram os estudos de *Escherichia coli* como possível agente etiológico de enfermidades semelhantes à cólera na Índia. As primeiras referências de cepas produtoras de enterotoxinas em animais jovens com diarreia apareceram em 1967, e em 1970 descobriram-se que as cepas virulentas produziam enterotoxinas (Sack, 1975).

As cepas de *Escherichia coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Como microrganismo potencialmente patogênico transmitido por alimentos, as reduzidas quantidades, geralmente aceitáveis, adquirem novo significado, em especial quando as condições do meio em que se encontra permitem sua multiplicação.

2.2 SINDROMES GASTROENTÉRICAS POR *Escherichia coli*

Anterior à década de 70, os informes sobre gastroenterites de origem alimentar relacionadas com *Escherichia coli* eram esporádicos, entretanto, o surto que ocorreu nos Estados Unidos, atribuído ao queijo importado, foi o centro de atenção sobre este microrganismo como patógeno transmitido por alimentos. O fato coincidiu com o interesse dos médicos microbiologistas pela *Escherichia coli* como causa de diarreia em crianças, levando a idealizar métodos "in vitro" específicos e seguros, e métodos de bioensaio para avaliar os componentes tóxicos e a uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência deste microrganismo (Jay, 1994).

As diferentes classes de *Escherichia coli* apresentam características e síndromes específicas reconhecidas internacionalmente ao longo do tempo.

As cepas de EPEC são agentes causais da diarreia infantil (lactentes) e recém nascidos [Robins-Browne, 1987; Padhye & Doyle, 1992; Hitchins *et al.*, 1995 (Revision A,

1998) CDC, 2000b; Meng *et al.*, 2001; Bettelheim, 2002], entretanto, muitos adultos são considerados portadores não apresentando sintomas da doença, levando a crer que a imunidade adquirida ocorra com o passar do tempo (World Health Organization Scientific Working Group, 1980; Padhye & Doyle, 1992; Meng *et al.*, 2001).

Cepas de *Escherichia coli* consideradas EPEC pertencem a um número restrito de sorotipos. Os sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142, O158 incluem sorotipos de EPEC. A diarreia por elas provocada é, clinicamente, mais grave do que aquelas provocadas por outros patógenos, sendo geralmente, acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, com duração de seis horas a três dias (média de 24 horas), cuja incubação varia entre 17 e 72 horas (média de 36 horas) (Senerwa *et al.*, 1989; Franco & Landgraf, 1996).

As cepas de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxinas são conhecidas como ETEC e um número limitado de sorotipos de *Escherichia coli* está associado com regularidade aos casos de diarreia. A síndrome se caracteriza por diarreia aquosa, é acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. A forma mais severa assemelha-se à cólera: fezes aquosas (água de arroz) que levam à desidratação. O período de incubação varia de oito a 44 horas (média de 26 horas) com alta dose de infecção (10^6 a 10^8 células). Em indivíduos desnutridos, a gastroenterite pode durar várias semanas, levando a um quadro de desidratação grave, e nos casos de diarreia dos viajantes, esta pode ser leve e autolimitante (Padhye & Doyle, 1992; Shuterland *et al.*, 1995; Franco & Landgraf, 1996).

As cepas de EIEC são capazes de penetrar em células epiteliais do cólon e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*. A maioria delas apresenta características bioquímicas peculiares que a torna diferente das demais cepas de *Escherichia coli*, tornando-a semelhante à *Shigella*, como a incapacidade de descarboxilar a lisina, a não fermentação ou fermentação tardia da lactose e ausência de flagelos. Os limitados sorogrupos conhecidos são O21, O28ac, O29, O112c, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167, O173. A gastroenterite é bastante semelhante àquela determinada por *Shigella*, com desintéria, cólicas abdominais, febre e mal estar geral com eliminação de sangue e muco nas fezes. O período de incubação varia entre oito e 24 horas (média de 11 horas). Estudos realizados com voluntários adultos indicam que a dose infectante é alta (10^6 a 10^8 células) (Padhye & Doyle, 1992; Shuterland *et al.*, 1995; Franco & Landgraf, 1996; Varnam & Evans, 1996; Meng *et al.*, 2001) enquanto que para a *Shigella* é de 10^3 ,

provavelmente devido a baixa resistência ao ácido gástrico e pela diferença da membrana protéica externa (Small & Falkow, 1988).

O grupo de *Escherichia coli*, denominado EHEC designado para alocar as cepas de *Escherichia coli* pertencentes ao sorogrupo O157:H7, incriminado como agente etiológico da colite hemorrágica, sendo proposta, atualmente, a inclusão do sorotipo O26:H11. Tais cepas têm algumas propriedades que as diferenciam das demais *Escherichia coli*, pois não são capazes de fermentar o sorbitol, são β -glucuronidase negativos e têm dificuldades de se multiplicar ou mesmo não se multiplicar nas temperaturas normalmente empregadas para pesquisa de *Escherichia coli* em alimentos (44,5°C/45,5°C) (Szabo *et al.*, 1986; Hitchins *et al.*, 1992; Willshaw *et al.*, 1993; Bourgeois *et al.*, 1994; Franco & Landgraf, 1996). A colite hemorrágica é caracterizada, clinicamente, por dores abdominais severas e diarréia aguda, seguida de diarréia sanguinolenta, diferindo das manifestações clínicas causadas por outros agentes invasores, pela grande quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre. O período de incubação varia de três a nove dias, com média de quatro dias. A duração da doença varia de dois a nove dias. A enterocolite pode evoluir gravemente para síndrome urêmica hemolítica com destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, necessitando de diálise, transplante dos rins e podendo ser fatal (Ryan *et al.*, 1986; Anon, 1987; Riley, 1987; Karmaly, 1989; USDA, 1994; Meng *et al.*, 1994; Weagant *et al.*, 1995; Franco & Landgraf, 1996; CDC, 2000a; Burcun, 2000; Phls, 2001; Acha & Szyfres, 2001; Meng *et al.*, 2001). Ainda não se sabe ao certo a dose infectante necessária para provocar os sintomas a partir da ingestão de alimentos contaminados, porém de acordo com dados obtidos de surtos esta parece ser baixa, entre 10 a 10000 células por grama ou mililitro de produto consumido (CDC, 1993; Lior, 1994). Para Buchanan & Edelson (1996) a dose infectiva é de 2 a 2000 células com base nos surtos, nos quais se mostraram acentuadamente ácido tolerante.

A cepa denominada *Escherichia coli* facultativamente enteropatogênica (FEEC), aparentemente associada a surtos esporádicos de diarréia, segundo Jay (1994); Franco & Landgraf (1996), tal relação, no entanto, não foi ainda provada.

Com referência às cepas enteroagregativas (EAggEC), são relatadas como sendo pertencentes a uma linhagem recentemente descrita, com poucos dados disponíveis ao seu respeito. A patogenicidade parece estar relacionada com a adesão à mucosa intestinal, sendo que o modelo de adesão é diferente daquele apresentado por EHEC, EPEC ou EIEC; ocorrendo principalmente no cólon, não sendo observada no íleo ou no duodeno, e é

manose resistente. A adesão é mediada por fímbrias que são na verdade, conjunto de microfibrilas associadas em feixes, chamadas BFP “BUNDLE FORMING PILUS”, que são diferentes das outras fímbrias de adesão. Alguns relatos indicam que cepas de EA_gEC são capazes de produzir toxinas, genericamente chamadas de enterotoxina termolábil (LT) e enterotoxina termoestável (ST) de acordo com sua resistência térmica, mas que são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas por ETEC e interferem no metabolismo celular do enterócito, com ação na absorção de sais e eletrólitos. Parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída) com sangue em 11% dos casos. Sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada (Bhan *et al.*, 1989; Franco & Landgraf, 1996; Harrigan, 1998).

Segundo Harrigan (1998), as cepas de *Escherichia coli* difusivamente aderente (DAEC) não estão caracterizadas e Meng *et al.*, (2001) associam cepas com diarreia infantil e os dados disponíveis à sua patogenicidade são raros e que nenhum surto associado a alimento foi noticiado.

2.3 RISCOS DE INFEÇÃO POR *Escherichia coli*

A susceptibilidade à infecção por *Escherichia coli* segue o exemplo habitual da idade, onde jovens e indivíduos susceptíveis às infecções sofrem grandes riscos. Infecções devidas às cepas de EPEC e ETEC são particularmente comuns na infância (CDC, 2000b) e sorotipos clássicos de EPEC usualmente associados somente com infecções em crianças com menos de 18 meses de idade. Nesta faixa etária, existe evidência de que o sexo masculino é mais susceptível que o sexo feminino (Antai & Anozie, 1987). As infecções por ETEC são somente, raramente, encontradas em áreas onde as infecções por EPEC estão presentes. Isto é provavelmente devido à competição pelos dois microrganismos pelos mesmos sítios de ligação intestinal.

O primeiro surto de EHEC ocorreu nos EUA em 1982, onde a *Escherichia coli* O157:H7 foi o agente determinante de colite hemorrágica (Riley *et al.*, 1983). Embora a epidemiologia, das cepas EHEC não esteja completamente estabelecida, os indivíduos com faixa de idades extremas, crianças menores de cinco anos e idosos, são mais sensíveis (Pai *et al.*, 1988; CDC, 2000a; CDC, 2000c; FSIS, 2000 a; FSIS, 2000b).

A síndrome urêmica hemolítica é mais comum em crianças menores de 10 anos de idade com sintomas mais evidentes e elevada letalidade (Robson *et al.*, 1991; Tarr, 1995) e em idosos. Isto pode refletir na adaptação do hospedeiro pelas cepas "Shiga-like" produtoras de toxina II, as quais são raras em pacientes com idade entre 16 e 61 anos (Ostroff *et al.*, 1989). O risco de infecção por EHEC é também aumentado pela gastrectomia, antibioticoterapia e agentes bloqueadores de H₂ (Edelman *et al.*, 1988).

Com exceção das cepas de EHEC, a prevalência da *Escherichia coli* patogênica é maior em países onde os padrões gerais de higiene são precários. Conseqüentemente as cepas de ETEC são mais comuns e em muitos casos a principal causa das diarréias dos viajantes (Padhye & Doyle, 1992; Shuterland *et al.*, 1995).

A diarréia infantil devido a EPEC foi anteriormente um problema em berçários onde a transmissão por funcionários, ou de criança para criança, pode ter sido importante veículo. Surtos ocorreram em berçários onde o controle diário não era rigoroso, mas em geral, onde há controle da higiene e em países desenvolvidos, a incidência de EPEC é baixa. Entretanto, o organismo ainda é a maior causa da mortalidade infantil. A alta incidência de EPEC significa que as crianças são expostas diretamente ao agente após a desmama. Crianças que consomem alimentos com formulação artificial são mais expostas ao risco que aquelas que se alimentam ao peito. Isto é comprovadamente devido a carência de água apropriada para reconstituir o alimento desidratado, embora a falha no desenvolvimento da microbiota intestinal protetora possa estar envolvida. Não existe dúvida que em países desenvolvidos a amamentação é mais divulgada (Duguid *et al.*, 1978), porém os esforços dos educadores de saúde freqüentemente fazem pequeno impacto contra a propaganda sedutora das fábricas de alimentos infantis (Varnam & Evans, 1996).

EIEC é rara em países desenvolvidos, e as pessoas de maior risco são aquelas que vivem em áreas onde a higiene é precária e outras doenças, particularmente a cólera, são endêmicas. Infecções com cepas de EIEC não estão associadas especificamente com diarréia dos viajantes, entretanto pessoas que visitam áreas onde a ocorrência é alta, estão obviamente expostas ao risco. Existem evidências de consideráveis variações geográficas nas infecções por EHEC. Por exemplo, a ocorrência é alta em Calgary, área do oeste do Canadá. Neste particular, pode ocorrer variação dentro do próprio país. Na Suécia, a ocorrência em Estocolmo, é de 1,3 casos por milhão de habitantes comparada com 15 casos por milhão de habitantes em Luanda (Edelman *et al.*, 1988).

O gado pode ser um importante reservatório de EHEC (Martin *et al.*, 1986; Borczyk *et al.*, 1987; PHLS, 2001; McNally, 2001; Bettelheim, 2002) e o consumo de leite cru ou carne crua ou insuficientemente cozida tem sido definido como um fator de risco, uma particular associação a ser considerada é o consumo de hambúrgueres em lanchonetes. Todavia, a tese de que EHEC é uma zoonose transmitida por alimento foi recusada por Walmer & Touws (1990), que considerou insuficientes as evidências existentes, para implicar o gado como a origem do organismo na doença humana. Outras pesquisas tem sustentado o conceito de que o gado é incriminado como um reservatório (Bryant *et al.*, 1989; Montenegro *et al.*, 1990; Fenlon, 2001), mas que o risco esteja associado com algum tipo específico de alimento. Entretanto, existe uma associação entre infecção por EHEC e a cocção e a manipulação imprópria dos alimentos (Bryant *et al.*, 1989; CDC, 2000a). A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo os mais susceptíveis os idosos e crianças menores de cinco anos, além de indivíduos imunodeprimidos ou com doenças renais (Weagant *et al.*, 1995).

2.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE POR CEPAS DE *Escherichia coli*

A virulência das cepas de EPEC está associada à capacidade de adesão à mucosa do intestino (Kaper, 1987), à invasão das células epiteliais (Donnenberg *et al.*, 1989; Milidis *et al.*, 1989) e à destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais, sendo esta adesão mediada por um plasmídeo (*eaf*) (Fletcher *et al.*, 1990) responsável pela síntese de um fator de enteroaderência. Esse fator corresponde a uma proteína de 50 a 70 KDa, e promove um tipo de aderência ao enterócito denominada localizada (AL), que é característica de EPEC, uma vez que outras cepas de *Escherichia coli*, quando aderem ao enterócito, têm modelo de aderência chamada difusa (AD) (Scaletsky *et al.*, 1984; Knuton *et al.*, 1987; Franco & Landgraf, 1996). Estudos de microscopia eletrônica têm demonstrado que cepas de EPEC são capazes de induzir profundas alterações no citoesqueleto das células epiteliais, com destruição das microvilosidades e acúmulos de actina no local de adesão. Esse efeito, denominado "attachment and effacement", é característico de EPEC e causado por uma proteína de 94KDa, chamada intimina, cuja produção é mediada por um gene cromossomial chamado *eae* ("*Escherichia coli* attaching and effacing"). Quando esse gene está ausente, não há destruição das microvilosidades,

indicando que os genes *eae* e *eaf* são interdependentes (Levine *et al.*, 1985; Franco & Landgraf, 1996).

Embora sejam relatadas a produção de enterotoxina termolábil (LT) e enterotoxina termoestável (ST) por EPEC, para Varnam & Evans (1996), tais afirmações se devem provavelmente a incompleta caracterização dos sorogrupos de EPEC e Bouzari & Varghese (1990), sugeriram que o grupo EPEC não produz enterotoxinas, ainda que possa causar diarreia, sendo o fator de aderência mediado por plasmídios e que algumas cepas elaboram uma toxina dilatadora citoletal (TDCL).

As cepas de ETEC são capazes de aderir à mucosa do intestino delgado e produzir toxinas resultando em diarreia aquosa. A adesão e colonização à mucosa intestinal são mediadas por estruturas protéicas (fímbrias) ou fatores de colonização, localizados na superfície celular bacteriana, codificadas por plasmídios (Danbara *et al.*, 1988; Pieroni *et al.*, 1988; Vsai *et al.*, 1990). Vários fatores de colonização têm sido descritos e são citados como espécie específicos, pois os fatores de colonização em ETEC humana somente são encontrados em ETEC causadora de diarreia em humanos, enquanto que fatores de ETEC de suínos só foram descritos em ETEC patogênica para suínos (Dubreuil *et al.*, 1991). O grupo ETEC pode produzir uma enterotoxina termolábil (LT) e/ou uma enterotoxina termoestável (ST). Sendo aquela inativada por um aquecimento à 60°C por 30 minutos e esta suporta a 100°C por até 30 minutos. Atualmente, são reconhecidos dois tipos imunológica e geneticamente distintos de LT, designados LT-I, LT-II. A toxina LT-I é estrutural e antigenicamente semelhante à enterotoxina colérica, sendo totalmente neutralizada pela antitoxina colérica. A toxina LT-II não é neutralizada pela antitoxina colérica, nem pela antitoxina a LT-I (Guth *et al.*, 1986). As toxinas LT-I e LT-II são proteínas de peso molecular 88 KDa e 83 KDa respectivamente (Kunkel & Robertson, 1979; Eidels *et al.*, 1983; Franco & Landgraf, 1996; Bettelheim, 2002). Foram descritas duas variantes da toxina LT-II, chamadas LT-IIa e LT-IIb, que são antigenicamente relacionadas, porém com atividades biológicas diferentes. As toxinas LT-I e LT-II são formadas por subunidade A e cinco subunidades B, arranjadas na forma de um anel que envolve a subunidade A. As subunidades B têm a função de fixação à mucosa do intestino, através de receptores monosialogangliosídicos presentes na membrana externa dos enterócitos (GM₁ no caso de LT-I, GD₁A no caso de LT-IIa e GD₁B no caso de LT-IIb). Após a fixação a subunidade A é internalizada pelo enterócito, onde age estimulando a adenilciclase, provocando acúmulo de AMP cíclico intracelular, sendo responsável pela

hipersecreção de água e eletrólitos, resultando em diarreia aquosa. Tais alterações nos processos secretórios e de absorção da mucosa intestinal não causam danos nos tecidos, razão pela qual as enterotoxinas são denominadas citotônicas e não citotóxicas (Franco & Landgraf, 1996). A enterotoxina ST, tem sido descrita como não imunogênica e de baixo peso molecular. ETEC produz tipos distintos de enterotoxina ST, designados ST-I (ou *Sta*) e ST-II (ou *Stb*). A toxina ST-I, constituída por 18 ou 19 aminoácidos, age ativando a guanilciclase (Guerrant *et al.*, 1980) que provoca um acúmulo intracelular de GMP cíclico, resultando em aumento da secreção de cloreto e diminuição da absorção de sódio. ST-II é um peptídeo diferente de ST-I, cujo mecanismo de ação não está bem elucidado. A produção das enterotoxinas LT-I, ST-I, ST-II e alguns fatores de colonização já descritos, são codificados por plasmídios. Por sua vez, a produção de toxina LT-II é codificada por genes cromossômicos (Hiroyama *et al.*, 1989; Franco & Landgraf, 1996), sendo isoladas de suínos (Bettelheim, 2002).

EIEC inicia o processo de invasão com a sua internalização pelo enterócito (endocitose) com modificação do seu citoesqueleto tornando o processo mais eficiente. Após internalizada, EIEC rompe a célula, multiplica-se e invade as células vizinhas, ocorrendo acúmulo de actina no local da invasão celular em um completo desarranjo da estrutura celular, determinando a morte celular (Franco & Landgraf, 1996). A diarreia provocada pela invasão das células epiteliais do intestino grosso (Schlager & Guerrant, 1988) causa necrose do tecido epitelial do cólon e diarreia sanguinolenta (Dupont *et al.*, 1991). Os sintomas são semelhantes aos da shigelose e a característica da invasividade, tanto da EIEC como da *Shigella*, está associada à presença de um plasmídeo (Silva *et al.*, 1982; Padhye & Doyle, 1992). EIEC e *Shigella* se assemelham bioquímica e antigenicamente, tendo como principal diferença o potencial patogênico, pois EIEC requer em torno de 10^9 células para causar doença, comparada com menos de 10^3 para *Shigella*. Isto provavelmente devido a menor resistência à acidez gástrica pela diferença na membrana protéica externa (Small & Falkon, 1988). Não existem evidências da produção de "Shigatoxin" ou alguma outra toxina pela EIEC (Cleary & Murray, 1988), e a virulência está inteiramente associada com a invasividade e a resposta provocada no tecido hospedeiro. À luz dos conhecimentos atuais, sabe-se que existem proteínas, denominadas IPA, diretamente relacionadas com a aproximação de EIEC ao enterócito e com a invasão. A síntese dessas proteínas é mediada por plasmídios (Silva *et al.*, 1982) denominados

"invasion", cuja expressão é regulada por genes cromossômicos (Franco & Landgraf, 1996).

EHEC tem o mecanismo de patogenicidade relacionado com a produção de citotoxinas denominadas verotoxinas (VTs), cuja atividade biológica pode ser observada em culturas de células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano, podem ainda ser chamadas toxinas "Shiga like" (SLTs), pois são semelhantes àquelas produzidas pelo bacilo Shiga (*Shigella dysenteriae*, tipo 1), causador da disenteria bacilar (O'Brien *et al.*, 1982; Weagant *et al.*, 1995). São proteínas de alto peso molecular, sendo conhecidas as variantes VT-I (ou SLT-I) e VT-II (ou SLT-II) sendo a primeira neutralizada pela toxina anti-shiga enquanto que a segunda não reage (Scotland *et al.*, 1985). Posteriormente, foi verificado que a verotoxina relacionava-se intimamente, em termos de estrutura e função com a toxina Shiga (*stx*) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, sendo então proposto o nome de "shiga-like toxins" (SLT) para identificar estas toxinas (O'Brien & Holmes, 1987). A dupla nomenclatura (VT/SLT) adotada para referir-se à toxina e suas variantes fez com que Calderwood *et al.* (1996), propusessem uma nova nomenclatura, reconhecendo essas toxinas como pertencentes a família das toxinas Shiga (*stx*). Nesta nomenclatura, as *Escherichia coli* que portam o gene *stx* ou elaboram *stx* são referidas como STEC ("Shiga toxin-producing *Escherichia coli*"). A produção destas é determinada por dois fagos lisogênicos distintos. Recentemente foi descrita a VT-III. As citotoxinas possuem duas subunidades, sendo uma delas responsável pela ligação à fração 60S dos ribossomos dos enterócitos, inibindo a síntese protéica. EHEC possui um gene cromossomal denominado *eae*, responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local de adesão. Verifica-se ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades, com eliminação de sangue nas fezes (Bettelheim, 2002). Embora a *Escherichia coli* do sorotipo O157:H7 seja a mais estudada, cepas de *Escherichia coli* pertencentes a diversos outros sorotipos já foram descritas como produtoras de citotoxinas (Franco & Landgraf, 1996).

As cepas de *Escherichia coli* produtoras de verotoxina pertencem a diferentes grupos sorológicos, mas apenas as linhagens associadas à colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (SUH) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (Johnson *et al.*, 1983; Karmali *et al.*, 1983; Karmali *et al.*, 1985; Riley, 1987; O'Brien & Holmes, 1987; Karmali, 1989; Caprioli *et al.*, 1992; Brasil, 2000; Bettelheim, 2002) são do sorotipo O157:H7 (Willshaw *et al.*, 1993; CDC, 2000; O'Brien, 2001).

Em conformidade com outras cepas de sua espécie, a O157:H7 tem seu “habitat” no solo, água contaminada e material em decomposição. Seu reservatório principal é o trato gastro-intestinal de bovinos, embora também já tenha sido isolada do trato intestinal de suínos e aves (Marks & Roberts, 1993; Meng *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997). Foi descrito um novo tipo de *Escherichia coli* produtora de hemolisina (enterohemolisina) sendo encontrada em 90% das cepas EHEC (Beutin *et al.*, 1989), porém a patogenicidade da enterohemolisina não é conhecida, entretanto sua produção é usada como marcador genético (Varnam & Evans, 1996).

Algumas cepas EHEC isoladas de animais produzem ST ou LT além de SLT mas a produção de ST ou LT não foi descrita em cepas humanas (Smith *et al.*, 1988).

A cepa denominada FEEC para Jay (1994); Franco & Landgraf (1996), está aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia e por não ter sido provada a sua existência, muitos autores deixam de mencioná-la.

Escherichia coli enteroagregativas são cepas patogênicas recentemente descritas, existindo poucos dados ao seu respeito. Sua patogenicidade parece estar relacionada com a adesão à mucosa intestinal, cujo modelo de adesão é diferente daquele apresentado por EHEC, EPEC ou EIEC. A adesão ocorre principalmente no cólon, não sendo observada no íleo ou no duodeno, e é manose resistente. A adesão é mediada por fímbrias que são, na verdade, um conjunto de microfibrilas associadas em feixes, denominados BFP (“bundle forming pilus”) que são diferentes das outras fímbrias de adesão. Alguns relatos indicam que cepas de EAaggEC são capazes de produzir toxina, genericamente chamadas LT e ST de acordo com sua resistência térmica, mas são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas por ETEC. Sabe-se também que EAaggEC interfere no metabolismo celular do enterócito, com ação na absorção de sais e eletrólitos que parece estar associada com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída). Entretanto, sua ocorrência em alimentos ou em casos de surtos de origem alimentar ainda não foi relatada (Franco & Landgraf, 1996). As cepas são autoaderentes, tendem à autoaglutinação, sob microscopia apresentam-se empilhadas. Suas características sorológicas, e as causas clínicas da doença precisam ser completamente descritas (Varnam & Evans, 1996; Harrigan, 1998). A maioria das cepas testadas possui plasmídeos de transferência de 55 a 65 MDa; em umas das cepas, o plasmídeo, é acompanhado de polissacarídeo, fímbria de expressão, com propriedades agregativas (Vial *et al.*, 1988). Lesões histopatológicas distintas são produzidas nos enterócitos das extremidades e laterais das vilosidades,

destruindo-as e tornando-as severamente ásperas. O núcleo apresenta o tecido conectivo desnudo permanecendo com a superfície hemorrágica (Bhan *et al.*, 1989). O envolvimento de uma toxina, possivelmente “Shiga-like” tem sido postulada, porém sem evidências (Varnam & Evans, 1996).

Sumário das cepas de *Escherichia coli* diarreio gênicas

CATEGORIA	SOROGRUPOS	FATORES DE VIRULÊNCIA
Enteropatogênica Categoria I	O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142	Produção de toxina “shiga”? Fímbria ou membrana protéica externa de adesão em algumas cepas.
Categoria II	O18, O44, O112, O114	
Enterotoxigênica	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167	Toxinas termolábeis e termoestáveis. Fatores de adesão
Enteroinvasiva	O28ac, O29, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167	Invasão epitelial
Enterohemorrágica	O26 ¹ , O157, O111	Altos níveis da toxina “shiga”. Fímbrias de adesão
Enteroaderente - agregativa	Não definido	Aderência epitelial. Produção de toxina?

1-Sorogrupo O26 foi originalmente categorizado como enteropatogênico, mas é atualmente considerado enterohemorrágico.

Fonte: Varnam, E.H. & Evans, M.G. Foodborne Pathogens. An illustrated text. Manson Publishing, p.103, 1996.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente, em países desenvolvidos, EPEC é isolada em surtos esporádicos com frequência muito baixa em casos de diarreia endêmica. Entretanto, em países em desenvolvimento, principalmente nos localizados em zona tropical EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, especialmente, na diarreia dos lactentes, com altos índices de mortalidade. No Brasil, EPEC é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses, com predominância dos sorotipos O111:[H⁻], O111:[H₂], O119:H₆ e O55:H₆. Entretanto, crianças com idade superior a um ano raramente são afetadas. Estudos recentes têm demonstrado que infecções

por EPEC podem estar associadas com diarreia crônica. Nos anos 60-70, diversos surtos causados pelo consumo de água e/ou de alimentos contendo EPEC foram registrados, em diversas partes do mundo. Esses surtos estavam associados com cepas pertencentes principalmente aos sorogrupos O86 e O111, envolvendo tanto crianças quanto adultos (Franco & Landgraf, 1996).

As bactérias pertencentes ao grupo ETEC são importantes causas de diarreia em países em desenvolvimento. Nas regiões endêmicas, onde as condições de saneamento são precárias, principalmente nos trópicos, a doença atinge pessoas de todas as faixas etárias, sendo considerados um dos principais agentes etiológicos da chamada “diarreia dos viajantes”, acometendo indivíduos que se locomovem de áreas desenvolvidas para regiões com problemas de saneamento básico. Nos EUA e na Europa, ETEC raramente é isolada em casos de diarreia esporádica, embora ocasionalmente surtos tenham sido registrados. Esses surtos ocorrem devido ao consumo de água ou de alimentos contaminados com ETEC (Franco & Landgraf, 1996).

Estas mesmas pesquisadoras ainda relatam que as cepas EIEC acometem mais comumente crianças maiores e adultos, contudo o seu isolamento de pacientes com diarreia não é freqüente. Alguns estudos têm apontado surtos relacionados com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados com EIEC, envolvendo principalmente o sorogrupo O124. Entretanto, acredita-se que a via de transmissão mais comum seja o contato interpessoal.

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC, razão pela qual os alimentos de origem animal principalmente a carne bovina parecem ser o principal veículo desse patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorridos nos Estados Unidos, Canadá e Japão foram claramente associados com consumo de hambúrgueres. Por isso, a síndrome provocada por EHEC tem recebido a denominação de “doença do hambúrguer” (Franco & Landgraf, 1996).

Inúmeros surtos se referem ao consumo de carne bovina mal cozida e diversos produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres, salsichas tipo “hot dog”), leite cru, vegetais consumidos crus, molhos preparados para saladas, maionese, e ainda cidra de maçã recém processada, implicada no surto ocorrido em Massachussets, 1993, onde maçãs contaminadas com adubo orgânico foram utilizadas no processamento da bebida (Bryant *et al.*, 1989; Griffin & Tauxe, 1991; Belongia *et al.*, 1993; CDC, 1993; Meng *et al.*, 1994; Miller & Kaspar, 1994). Em conformidade com Del Rosário & Beuchat (1995), frutas com pH próximo de 7,0, como melancia, podem servir de substrato para patógenos como

Escherichia coli O157:H7. Tais pesquisadores desenvolveram um estudo da sobrevivência dessa bactéria em melancia, inoculando uma população conhecida da O157:H7, e observaram que a microbiota teve grande aumento em cubos da fruta incubados à 25°C por 34 horas e foi rapidamente inativada à 5°C na superfície da fruta.

Dentre os alimentos, a carne bovina é uma das fontes potenciais de *Escherichia coli* O157:H7, pelo fato que o trato gastro-intestinal de bovinos é reservatório intermediário desses microrganismos (Knight, 1993; CDC, 2000a; Phls, 2001; Bettelheim, 2002). A contaminação cruzada, pode ocorrer no abate, se houver contato das vísceras com a carne e superfície dos equipamentos (USDA, 1994; CDC, 2000). A literatura descreve que 1% dos bovinos adultos dos Estados Unidos é portador assintomático de *Escherichia coli* O157:H7, nos animais jovens a percentagem é significativamente maior, em torno de 40% (Wuetherich, 1994). O leite cru quando em comparação com os produtos de carne bovina, parece relativamente menos importante como veículo transmissor da O157:H7, pois em conformidade com dados de ocorrência de surtos nos Estados Unidos da América do Norte (CDC, 1993), o leite cru foi associado em apenas dois surtos no período de 1982 a 1993, enquanto a carne bovina foi implicada em 15 surtos, no mesmo período, com um saldo de 900 pessoas afetadas. No entanto, é necessário considerar que, naquele país, o consumo de leite cru é muito pequeno, em relação ao de carne bovina, especialmente moída e hambúrgueres (USDA, 1994; Silva *et al.*, 1997). Outros produtos lácteos podem albergar *Escherichia coli* O157, conforme descrito por Duarte *et al.* (1997).

O sorotipo O157:H7 é o mais implicado como agente etiológico de colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica (CDC, 1995). Relatos de cepas O157:H⁻ produzindo Stx₂ em pacientes com síndrome urêmica hemolítica foram descritos por Gunzer *et al.* (1992) na Alemanha e por Aleksic *et al.* (1992) e Bitzan *et al.* (1993) na Europa Central. Na Austrália, segundo Goldwater & Bettelheim (1995) as cepas O111:H⁻ e O157:H⁻ são comumente isoladas. Feng *et al.* (1998) citam que as cepas de *Escherichia coli* O157:H⁻ são geneticamente pertencentes ao grupo clonal O157:H7 e embora fermentem o sorbitol, são positivas para glucuronidase. Nos Estados Unidos somente variantes de O157:H7 glucuronidase positivas foram isoladas (Hayes *et al.*, 1995). Paton *et al.* (1996) e Bettelheim (2002) confirmaram que as cepas de EHEC sorotipos O111:H⁻ e O157:H⁻ foram isoladas de pacientes com diarreia e de alimentos.

2.6 PORTADORES HUMANOS DE *Escherichia coli*

Ao referir-se aos portadores humanos de *Escherichia coli* é de suma importância a distinção feita entre cepas não patogênicas que estão presentes no intestino da maioria da população, e cepas que são reconhecidas como enteropatogênicas. A maioria dos noticiários sensacionalistas referentes à higiene de alimentos, publicados nos últimos anos da década de 80, falhou em reconhecer esta distinção, resultando em conclusões equivocadas (Varnam & Evans, 1996). Para estes autores, os portadores "sãos", em muitos casos, na verdade, são acometidos por infecções brandas, não reconhecidas, ou infecções assintomáticas. Os adultos são, em geral, relativamente, resistentes às infecções por EPEC, e são conhecidos casos, onde crianças são infectadas pelo contato com adultos aparentemente saudáveis. Tal fato pode ocorrer na família, particularmente em casos onde se vive em condições de pobreza, contudo, importância particular é dada aos berçários.

Existem também portadores assintomáticos com cepas de ETEC que produzem toxina termolábil. A ocorrência de portadores é, obviamente, alta onde as infecções pelo organismo são comuns, e foram encontradas em 6% de 223 estudantes saudáveis de uma Universidade mexicana (Pickering *et al.*, 1977). O estado de portador é transitório, contudo, pode ser importante na propagação da infecção (Varnam & Evans, 1996).

A ocorrência de portadores de ETEC varia de acordo com o sorogrupo. Diferenças na distribuição geográfica dos sorogrupos podem, em consequência disso, comandar a variação da ocorrência de portadores de uma região para outra. Por exemplo, o sorogrupo O126 que foi isolado somente em Hong Kong e Guangzhon, apresentou baixa ocorrência de portadores nestas localidades (Yam *et al.*, 1988).

A extensão dos portadores humanos de cepas de EIEC não é conhecida (Varnam & Evans, 1996), e os autores relatam que devem ser vistos com cautela os riscos de transmissão de EHEC por portadores, através de enfermeiros, em asilos e instituições similares, pois existem evidências de serem altos, devido a grande susceptibilidade dos jovens e idosos, onde as infecções podem ser resultado de exposições sucessivas, contribuindo para disseminação da infecção.

2.7 *Escherichia coli* NO AMBIENTE

Apesar da *Escherichia coli* ser encontrada no intestino do Homem e de outros

animais, freqüentemente adota-se que as cepas produtoras de diarreia, com exceção das cepas enterohemorrágicas, são de origem humana. Em alguns casos, os isolamentos têm ocorrido de animais, sugerindo com base em dados limitados, que algumas cepas ETEC responsáveis por doenças humanas podem ser carregadas pelo intestino dos animais (Doyle & Padyhe, 1989).

O organismo é excretado em grandes quantidades, penetrando nos cursos d'água e, onde a higiene é precária, tanto quanto em ambientes através de esgoto. Existem evidências que *Escherichia coli* persiste em água doce e água estuarina por períodos menores que a *Salmonella*, porém em muitas situações a contaminação é ininterrupta (Varnam & Evans, 1996; Bettelheim, 2002). Os bovinos são considerados reservatórios de *Escherichia coli* O157:H7, e a transmissão zoonótica de cepas patogênicas de animais para o Homem pode ocorrer (Dorn *et al.*, 1989). Nos Estados Unidos este sorotipo é mais comum no gado leiteiro adulto que no gado de corte mais jovem (Karmaly, 1989; Varnam & Evans, 1996). Provavelmente, outros animais e pássaros também são reservatórios do sorotipo O157:H7. O organismo pode colonizar rapidamente o ceco de frangos sendo excretado por vários meses (Beery *et al.*, 1985). O isolamento da bactéria de cortes de carne suína e cordeiro (Doyle & Schoeni, 1987) sugere que suínos e ovinos sejam reservatórios (Varnam & Evans, 1996). As pesquisas revelam somente um isolamento de O157:H7 de um animal doente, um novilho. Outros sorogrupos são causas comuns de diarreia em bovino (Orskov *et al.*, 1987) e diarreia e doença do edema em suínos (Smith *et al.*, 1988), não considerados patogênicos para o Homem (Varnam & Evans, 1996).

Comparando-se cepas não O157:H7 isoladas de pessoas com cepas de sorogrupos isolados de bovinos e cordeiros, mostram diferenças com respeito a produção de VT, perfis plasmidiais e propriedades adesivas (Dorn *et al.*, 1989).

O isolamento de EHEC sorotipo O157:H7 tem ocorrido em reservatório de água não tratada nos Estados Unidos (McGowan *et al.*, 1989). Não existiam evidências de contaminação de fontes humanas ou bovinas, porém considerou-se a possibilidade de cervos selvagens terem acesso às margens do reservatório (Varnam & Evans, 1996).

2.8 ALIMENTOS CÁRNEOS ENVOLVIDOS NA CONTAMINAÇÃO POR *Escherichia coli*

Nas regiões onde a *Escherichia coli* produtora de diarreia é endêmica, geralmente, não é possível associar-se uma infecção por alimentos específicos, principalmente em países desenvolvidos, mesmo quando um grande número de casos está envolvido. Em parte, isto pode ser devido a rara ocorrência de infecção por *Escherichia coli*, ou dificuldade no isolamento de sorotipos patogênicos. Entretanto, em alguns casos, os manipuladores de alimentos podem ser, propriamente, mais importante que alimentos específicos (Varnam & Evans, 1996), assim como equipamentos (Bettelheim, 2002)

Tamminga *et al.* (1982) relataram a presença de *Escherichia coli* em carne moída, informando que somente parte da *Escherichia coli* da microbiota de alimentos é patogênica.

Laubach *et al.* (1998) concluíram que em 75% das amostras de carne de cabeça de suíno, usadas na produção de embutidos, quando analisadas bacteriologicamente, sempre o número de coliformes foi superior ao número de *Escherichia coli*.

Apesar da EPEC ser bem definida como causadora de diarreia entre crianças, particularmente em países em desenvolvimento, é raramente considerado como causa em adultos, e existem, relativamente poucas informações sobre alimentos associados com infecções por EPEC (Varnam & Evans, 1996). Produtos cárneos foram incriminados em dois surtos distintos no Reino Unido envolvendo carne de porco resfriada e pastéis de carne (Doyle & Padyhe, 1989; Bettelheim, 2002).

Ocorreram alguns grandes surtos de ETEC sem que houvesse associação com alimentos. Em alguns casos, a contaminação de um número de alimentos, por manipuladores infectados, foi comprovada. Também está provado que os manipuladores de alimentos podem ser um importante veículo na transmissão de ETEC nas diarreias dos viajantes (Bettelheim, 2002), desde que a propagação de pessoas a pessoas, entre adultos, seja rara (Varnam & Evans, 1996). ETEC foi isolada de 10% de produtos cárneos obtidos de supermercados em São Paulo, porém, nenhum dos isolamentos pertencia aos sorogrupos associados com diarreia humana ocorrida na cidade (Reis *et al.*, 1980). Oito por cento das cepas de *Escherichia coli* isoladas de uma variedade de alimentos nos Estados Unidos foram identificadas como EPEC, porém o sorogrupo mais comum foi O149, o qual está mais apropriadamente associado com doença em leitões do que em humanos (Doyle & Padyhe, 1989). De 240 *Escherichia coli* isoladas de alimentos somente 19 (8%) foram consideradas enterotoxigênicas (Sack *et al.*, 1977).

As infecções por EIEC são raras em países desenvolvidos, os surtos são esporádicos e as fontes de infecção, frequentemente permanecem desconhecidas. O sorogrupo O124 tem sido implicado em surtos, inclusive, em um dos primeiros a ser completamente identificado onde salmão enlatado foi o veículo suspeito da infecção. Em alguns surtos mostram a importância da transmissão de EIEC por pessoa a pessoa e o provável envolvimento do ciclo oral - fecal (Doyle & Padyhe, 1989).

As infecções por EHEC têm sido relacionadas epidemiologicamente com carne moída para hambúrgueres (Riley, 1987; CDC, 2000a; Burcun, 2000). As primeiras evidências foram obtidas de surtos nos estados do Oregon e Michigan, que envolveram 26 e 21 casos respectivamente (Riley *et al.*, 1983). Um surto em que foram afetados 31 estudantes no Minnesota foi atribuído a pastéis de carne. Nestes casos, o produto foi mal cozido, entretanto, o caso de subcozimento ocorreu na indústria de processamento, mais propriamente do que em serviço de alimentação (Varnam & Evans, 1996).

Carnes cozidas, resfriadas, provavelmente, enrolado de peru, foram implicados como causa do ponto de origem de um surto da comitiva participante de um batismo (Salmon *et al.*, 1989). Embora a possibilidade da contaminação ter ocorrido durante a manipulação das refeições no local onde eram preparadas, não ser totalmente descartada, a carne foi provavelmente contaminada antes do empacotamento (Varnam & Evans, 1996).

Relativamente poucas informações são disponíveis referentes à ocorrência de EHEC em alimentos em nível de supermercado. Estudos nos Estados Unidos e Canadá têm mostrado a presença do sorotipo O157:H7 em 3,7% de carne bovina moída, 1,5% em carne suína, 1,5% em carne de aves e 2,0% em amostras de carne de cordeiro. A incidência do organismo foi alta (31% de amostras de carne bovina) em Calgary, oeste do Canadá, e estava correlacionada com a alta ocorrência da infecção na área (Doyle & Schoeni, 1987).

Conforme citações anteriores, as diferentes cepas de *Escherichia coli* se destacam como importante agente etiológico das diarreias em nível mundial, apresentando maior incidência nos países em desenvolvimento que nos desenvolvidos. Os alimentos de origem animal apresentam-se como um dos principais fatores na cadeia epidemiológica das gastroenterites por *Escherichia coli*, ressaltando-se as cepas EPEC, ETEC, EHEC, entretanto, no Brasil poucos são os dados a este respeito, e as principais pesquisas datam do início da década de oitenta. Reis *et al.* (1980), verificaram a presença de *Escherichia coli* produtoras de LT em amostras de quibe, hambúrguer e salsicha num percentual de 5%, 7,5% e 10%, respectivamente, num total de 120 amostras analisadas. Petri *et al.* (1989, a,

b) isolaram amostras EPEC em produtos cárneos, em Londrina. Jakabi & Franco (1991) pesquisaram EPEC e ETEC em alimentos de origem animal comercializados em São Paulo. Franco *et al.* (1991) isolaram *Escherichia coli* sorogrupo O15 em carne crua bovina. Cerqueira (1993) analisando 105 amostras, sendo que 35 de carne bovina moída, 35 de hambúrguer congelado e 35 de quibe/almôndega, comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, encontrou, respectivamente, 15, 16 e cinco amostras positivas para *Escherichia coli* enteropatogênica. Quanto a presença de coliformes totais, 97,0% das amostras de carne moída e hambúrguer, e 49,0% de quibe/almôndega estavam fora do padrão pré estabelecido, enquanto que para coliformes fecais 85,0% das amostras de carne moída, 54,3% de hambúrguer e 5,9% de quibe/almôndega estavam impróprias para consumo. Cerqueira *et al.* (1997) avaliaram a ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em carne bovina crua obtendo cepas de *Escherichia coli* produtoras de VTs, nenhuma EHEC sorotipo O157:H7, porém classificaram cepas ETEC e EPEC.

Korsak *et al.* (1998), consideram que a técnica de amostragem é fundamental para a detecção de patógenos em carcaça de suíno e isolaram *Escherichia coli* em 14% das amostras pesquisadas. Gill *et al.* (1995) sugeriram que a cavidade pélvica de bovino seja usada para obtenção de amostras para pesquisa de *Escherichia coli*. Gill & Jones (1998), ao compararem dois métodos de colheita e enumeração de *Escherichia coli* em carcaças suínas concluíram que a obtenção em três pontos distintos apresentava resultados equivalentes ao método reconhecido nos Estados Unidos.

Pesquisas desenvolvidas no Brasil procuram mostrar a importância dos coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* como indicadores higiênico-sanitários na obtenção, nas fases tecnológicas, no processamento e/ou na comercialização de produtos cárneos; e dos possíveis riscos que podem acometer aos consumidores, entre os quais citam-se: Franco (1983) enumerou coliformes totais e coliformes fecais em charque embalado à vácuo, obtendo 30,0% e 5,0% de amostras positivas para os respectivos microrganismos em questão, e ao proceder o mesmo estudo em charque a granel encontrou 97,5% e 32,5% dos mesmo microrganismos, sendo que nos 32,5% das amostras contaminadas por coliforme fecal confirmaram a presença de *Escherichia coli*. Carvalho *et al.* (1985a) ao procederem a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em amostras de carne moída encontraram os seguintes níveis de contaminação: *Klebsiella* (6%), *Citrobacter* (37,5%), *Enterobacter* (43,75%), *Escherichia coli* (81,25%), demonstrando falhas no processamento, más condições de manipulação e riscos à saúde pública. Carvalho *et al.*

(1985b), ao verificarem a ocorrência de coliformes totais e fecais em embutido fresco, encontraram, respectivamente, NMP médio de 1267/grama e 604 por grama. Nas amostras positivas (89,0%), foram isoladas 77,0% de *Escherichia coli* e 44,0% de *Enterobacter aerogenes*. Cerqueira & Franco (1986) avaliaram as condições higiênico-sanitárias de embutido cozido (mortadela) encontrando NMP médio de coliformes totais e fecais, de 1430 por grama de amostra, sugerindo que o produto em questão se apresentava inadequado ao consumo com base na legislação vigente. Petri *et al.* (1989a) verificaram a frequência de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em amostras de carne moída (100) e quibe cru (93), e observaram que 93,7% do total (193) continham *Escherichia coli* sendo que 8,8% apresentaram sorogrupos EPEC. Em 7,2% das amostras de carne moída evidenciaram os sorogrupos O26, O119 e O125 e em 10,7% das amostras de quibe cru foram isolados os sorogrupos O26, O142, O55 e O127. Petri *et al.* (1989b) mencionam que 93,0% das amostras de carne moída e 90,3% das de quibe cru estavam contaminadas por *Escherichia coli* em estudo desenvolvido em produtos cárneos, sem no entanto detectar nenhuma cepa enterotoxigênica. Calderon & Furlanetto (1990) pesquisaram coliformes totais e fecais em carnes suínas, encontrando 60,0% das amostras positivas para coliformes totais com NMP superiores a $10^3/g$ e 23,3% positivas para coliformes fecais e, em particular, *Escherichia coli*, apresentando valores acima do máximo permitido ($3 \times 10^2/g$) pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Fuzihara & Franco (1993) encontraram 51,0% de amostras de carnes suínas contaminadas por coliformes fecais com NMP acima de $10^3/g$ num total de 100 amostras analisadas. Martins *et al.* (1993) verificaram a presença de coliformes totais em 15,0% das amostras de lingüiça defumada analisadas, não sendo detectados coliformes fecais. Oliveira *et al.* (1996) relatam que em análise de lingüiça fresca de porco, 31,0% e 11,9% apresentaram NMP de coliformes totais e fecais, respectivamente, acima do preconizado pela legislação vigente, sugerindo melhora nas condições higiênico-sanitárias no processamento tecnológico e comercialização. Campos & Serafini (1997) ao estudarem a presença de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em carne bovina crua sugeriram que 53,0%, 40,0% e 30,0% das amostras analisadas possuíam os respectivos microrganismos com contagens acima de 10×10^2 . Florentino *et al.* (1997) pesquisaram coliformes totais e coliformes fecais em carne bovina moída comercializada em feiras livres e supermercados e concluíram que os resultados foram bastante semelhantes, sugerindo que a contaminação do alimento vem desde a sua obtenção nos matadouros

públicos. Franco & Chaves (1997) em análises bacteriológicas procedidas em lingüiça frescal suína reportaram que 75,0% das amostras analisadas apresentaram coliformes fecais e 65,0% *Escherichia coli*, encontrando-se fora dos limites estabelecidos pelos padrões de identidade e qualidades vigentes, representando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e riscos à saúde pública. Martins *et al.* (1997) na avaliação higiênico-sanitária de lingüiças tipo frescal (mista, suína, frango) e lingüiça defumada advertiram que 53,0% de lingüiça mista, 37,0% de carne suína, 31,6% de carne de frango estavam em desacordo com a legislação vigente, entretanto, as lingüiças defumadas se encontravam nos padrões microbiológicos exigidos pelo Ministério da Saúde. Rall *et al.* (1997) relataram que 25,0% das amostras de carne analisadas estavam fora do padrão tendo em vista a presença de coliformes totais e fecais com NMP respectivos de até 1×10^8 e $1,1 \times 10^4$ com base no Decreto n.º 12.486 de 20.10.1978 do Estado de São Paulo. Viestel *et al.* (1997) encontraram coliformes fecais em amostras de lingüiça de frango cujo NMP médio de 1,85 log/g indicou condições higiênicas insatisfatórias. Bersot *et al.* (1998) estudando carne suína encontraram em 36,0% das amostras analisadas, coliformes fecais e *Escherichia coli* em quantidades suficientes para considerá-las impróprias ao consumo. Oliveira *et al.* (1999), isolaram coliformes fecais e *Escherichia coli* em 100% de amostras de hambúrguer de frango, encontrando NMP que variou de 4 a 460 coliformes fecais e *Escherichia coli* por grama de amostra analisada. Pinto *et al.* (1999) avaliaram microbiologicamente produtos embutidos, sendo que 18,3% das amostras de lingüiças possuíam números superiores a 5×10^2 coliformes por grama do produto. Sabioni *et al.* (1999) ao analisarem lingüiça frescal concluíram que 23,3% das amostras analisadas eram inaceitáveis para o consumo direto por apresentarem Número Mais Provável de coliformes fecais de 10 e até 100 vezes acima dos limites estabelecidos. Xavier *et al.* (1999) ao analisarem amostras de carne bovina moída verificaram que 100% delas possuíam contaminação por coliformes e *Escherichia coli* na ordem de até 1×10^6 de coliformes por grama do alimento.

Epidemiologicamente, a microbiota do trato intestinal de suínos pode exercer importante papel no impacto ambiental em função do destino a ser dado aos dejetos oriundos dos abatedouros, como também pode colocar em risco os alimentos, manipuladores e equipamentos, por contaminação cruzada, a própria carne suína e seus derivados, pela *Escherichia coli*, uma vez que este organismo, conforme citações contidas em Smith (1961, 1965), onde elucidam que durante o primeiro dia de vida o pH do

conteúdo estomacal do suíno está entre 5,3 – 5,9 proporcionando um rápido crescimento de *Escherichia coli*. Após o primeiro dia o pH tende a cair, ocorrendo o decréscimo de *Escherichia coli* e outros organismos como *Clostridium perfringens* e *Streptococcus* spp devido ao desenvolvimento do *Lactobacillus* spp. que se torna a microbiota predominante do estômago e do intestino delgado. No intestino grosso a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Streptococcus* spp. constituem a microbiota inicial predominante, porém ao longo do tempo são substituídos pelos anaeróbios estritos. Em torno do terceiro dia a microbiota fecal é constituída por *Escherichia coli* (10^{10} por grama), *Clostridium perfringens* (10^8 por grama), *Streptococcus* spp. (10^9 por grama) e *Lactobacillus* spp. (10^8 por grama). Anaeróbios não esporulados aparecem em grandes números (10^{10} por grama) e conseqüentemente o número de *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. e, particularmente, *Clostridium perfringens* é reduzido. Como ocorre em outras espécies animais, o desenvolvimento da microbiota típica do trato intestinal dos suínos adultos protege o trato intestinal, presuntivamente contra o crescimento e infecção pela *Salmonella* spp. Kapelmacher *et al.* (1969) enfatizaram que suínos jovens são mais susceptíveis à infecção por *Salmonella* spp. que suínos adultos.

Devido à onipresença da *Escherichia coli* em fezes de animais, ela comumente alcança carcaças e cortes de carne durante o abate e o processamento. O organismo pode multiplicar-se na superfície e equipamentos, deste modo sua presença sobre a carne pode não indicar contaminação fecal direta.

2.9 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *Escherichia coli* EM ALIMENTOS

Em geral o comportamento da *Escherichia coli* em alimentos é semelhante aos de outros membros da família *Enterobacteriaceae*, entretanto, alguns fatores podem diferir. Notam-se que em alguns casos, ocorrem condições limites que não são as mesmas para as cepas patogênicas de *Escherichia coli*, as quais podem exigir cuidados especiais desde que o comportamento das cepas patogênicas seja diferente (Varnam & Evans, 1996). Tal como todas as bactérias a sobrevivência e crescimento da *Escherichia coli* em alimentos são dependentes da interação de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como temperatura, irradiação, pH, atividade de água, ingredientes de cura, competição com outros microrganismos, (Varnam & Evans, 1996; Buchanan & Doyle, 1997). Com ênfase à

temperatura, o padrão geral de crescimento de *Escherichia coli* situa-se na faixa de 7 a 48°C com o ótimo de temperatura em 37°C. Porém, existem exceções que envolvem as cepas patogênicas (Varnam & Evans, 1996). Cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* são reconhecidas como patógenas de baixa temperatura (Palumbo, 1986) e algumas cepas, senão todas, crescem entre 4 - 5°C, e possivelmente em temperaturas menores. Evidências circunstanciais sugerem que algumas cepas de patógenos, incluindo O157:H7, são também capazes de crescer abaixo de 5°C, entretanto, necessitam de comprovações definitivas. A temperatura máxima de crescimento da *Escherichia coli* O157:H7 é mais baixa do que para outros sorotipos, e inúmeras cepas são incapazes de crescer à 44°C, temperatura esta usada rotineiramente durante o isolamento de *Escherichia coli*. Todavia, cepas incapazes de crescerem a 44°C podem ser mais comuns do que é estimado. Apesar de todas as cepas patogênicas de *Escherichia coli* serem capazes de crescer a 37°C, a temperatura ótima de crescimento para algumas delas é abaixo de 30°C (Varnam & Evans, 1996). A temperatura mínima de crescimento para *Escherichia coli* O157:H7 sob condições ótimas é aproximadamente 8 - 10°C (Buchanan & Bagi, 1994; Rajkowski & Marmer, 1995). O efeito da temperatura sobre o crescimento da *Escherichia coli* tipo I e EHEC foi determinado, e modelos matemáticos são desenvolvidos, para descrever como a temperatura interage com pH, água e nitrito de sódio para afetar o crescimento cinético (Gil & Phillips, 1985; Buchanam & Bagi, 1994; Sutherland *et al.*, 1995).

A resistência térmica de *Escherichia coli* é semelhante à dos sorotipos de *Salmonella* e os valores D são tipicamente de 5 minutos a 55°C, 0,1 minutos a 60°C, ocorrendo variação de acordo com a natureza do líquido dissolvente e a variedade da cepa. Não existe qualquer evidência que alguma cepa de *Escherichia coli* seja suficientemente resistente ao calor para sobreviver à pasteurização corretamente aplicada ou cocção. *Escherichia coli* é capaz de a sobrevivência prolongada em alimentos congelados. Por exemplo, o sorotipo O157:H7 sobrevive acima de nove meses à -20°C em carne bovina moída (Doyle & Schoeni, 1984; 1987).

Quanto à irradiação, a sensibilidade da *Escherichia coli* é similar à da *Salmonella* spp., e a dose de 3 kGy proposta para controlar este microrganismo é também efetiva contra *Escherichia coli* (Varnam & Evans, 1996).

Referindo-se ao valor do pH, ICMSF (1980), descreve que a *Escherichia coli* é capaz de crescer bem na faixa compreendida entre 4,0 e 9,0. Para Varnam & Evans (1996), existem interações com outros fatores incluindo temperatura, atividade de água e natureza

do acidulante. A faixa de pH, para crescimento de *Escherichia coli*, está entre 5,5 e 7,5, porém declina rapidamente em valores de pH menores (Buchanam & Klawitter, 1992). O pH mínimo para crescimento de *Escherichia coli* é 4,0 – 4,5 (Buchanam & Bagi, 1994), sendo este dependente da interação com outros parâmetros de crescimento. Por exemplo, estresses adicionais aumentam o pH mínimo para crescimento; o tipo de ácido (orgânico ou inorgânico) e sua concentração influenciam o efeito do pH sobre o crescimento da *Escherichia coli*. Abdul-Raouf *et al.* (1993), descreveram que, em pastas de carne bovina, a relativa inibição da *Escherichia coli* O157:H7 ocorreu pela adição de ácidos orgânicos acético > lático ≥ cítrico. Quando a queda do pH é abaixo do mínimo para o crescimento, a população de *Escherichia coli* O157:H7 declina extraordinariamente. A sobrevivência dos patógenos em alimentos ácidos tornou-se particularmente importante, desde que inúmeros surtos foram associados aos baixos níveis de *Escherichia coli* O157:H7 sobrevivendo em alimentos ácidos, como salsichas, cidra e suco de maçã. Experimentalmente foi demonstrada a sobrevivência de patógenos por várias semanas a meses numa variedade de alimentos ácidos incluindo maionese (Zhao & Doyle, 1994) e salsichas (Clavero & Beuchat, 1996). A sobrevivência, nestes alimentos, é notavelmente prolongada quando estocados a temperatura de refrigeração (Buchanam & Doyle, 1997). A indução da *Escherichia coli* à tolerância ácida pode aumentar sua sobrevivência em alimentos ácidos (Leyer *et al.*, 1995; Cheville *et al.*, 1996), sendo este aumento associado à expressão de genes regulados pelo *rfoS* "sigma factor operon" (Small *et al.*, 1994; Rowbury, 1995; Cheville *et al.*, 1996). O estado de tolerância ácida pode persistir por longos períodos (≥ 28 dias) se as células são estocadas a temperatura de refrigeração. A indução de tolerância ácida pode também acentuar a habilidade dos organismos a sobreviver a outros estresses. Alguns estudos têm indicado que a indução à tolerância ácida também aumenta a resistência dos microrganismos ao aquecimento, radiação e antimicrobianos (Rowbury, 1995). *Escherichia coli* também possui uma resposta induzida à tolerância alcalina (Rowbury *et al.*, 1996).

O nível mínimo de atividade de água ("aw") para o crescimento da *Escherichia coli* onde as condições são ótimas, é de 0,95 (Varnam & Evans, 1996). Estudos referentes ao efeito da atividade de água na sobrevivência e crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 enfoca principalmente o efeito do cloreto de sódio, ainda que, provavelmente, *Escherichia coli* O157:H7 comporte-se semelhante às outras *Escherichia coli* (Buchanan & Doyle, 1997). Buchanan & Bagi (1994), desenvolveram um modelo matemático para calcular os

efeitos e interações das concentrações de NaCl (0,5 - 5,0%) com temperatura, pH e NaNO₂ sobre o crescimento cinético da *Escherichia coli* O157:H7. Eles compararam o efeito do manitol, sorbitol e sacarose como umectantes e concluíram ainda, que umectantes diferentes apresentavam valores limitados de atividade de água, as diferenças entre umectantes eram de, no mínimo, 0,98 ("aw"), tal como, Buchanan & Bagi (1997). O crescimento da *Escherichia coli* em níveis elevados de NaCl induz a expressão *rpoS* com associado aumento na termotolerância e resistência ao peróxido de hidrogênio (Hengge - Aronis *et al.*, 1993). *Escherichia coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas quando dessecada, particularmente sob temperatura de refrigeração (Bagi & Buchanan, 1993).

O efeito da combinação dos ingredientes de cura sobre uma mistura de cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* foi estudada por Gibson & Roberts(1986). O aumento da concentração de NaCl para crescimento foi de 6,0%, porém o crescimento nesta concentração ocorreu somente em pH com valores entre 5,6 e 6,8 e as temperaturas entre 15 e 35°C. Em pH 5,6, o crescimento entre 10 e 15°C foi inibido por 200 mg/l de NaNO₂ e a 20°C por 400 mg/l de NaNO₂. O crescimento ocorrido em algumas combinações de O a 4% de NaCl e O a 400mg/l de NaNO₃ com pH entre 6,2 a 6,8 em temperaturas entre 15 e 35°C, *Escherichia coli* foi em algumas vezes mais resistente que *Salmonella* spp. (Varnam & Evans, 1996). *Escherichia coli* parece não ter nenhum aumento de resistência aos aditivos alimentares antimicrobianos (Buchanan & Doyle, 1997).

Escherichia coli compete melhor com microrganismos de deterioração do que com a *Salmonella* spp., e, em alimentos fermentados, pode alcançar números significativos após competição com bactérias ácido lácticas. Contudo, em baixas temperaturas *Escherichia coli* é provavelmente encoberta pelos microrganismos psicrófilos deteriorantes, tais como *Pseudomonas* spp., e ao igualar-se, é capaz de crescer abaixo de 5°C na ausência de competição (Varnam & Evans, 1996).

2.10 MÉTODOS ANALÍTICOS LABORATORIAIS, CONVENCIONAIS, PARA O ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

As técnicas convencionais de cultivo compreendem a fase de recuperação da célula injuriada, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e técnica sorológica para a

detecção específica de *Escherichia coli* produtora de diarreia (diarreiogênica). Embora a necessidade de recuperação na determinação de *Escherichia coli* na água, seja reconhecida (Hartman *et al.*, 1986), relativamente pouca atenção tem sido dada para recuperação de *Escherichia coli* em alimentos principalmente quando comparada com *Salmonella* spp. Entretanto, inúmeros protocolos de enumeração incluem a fase de recuperação. Caldos não seletivos tais como caldo nutriente, tripticase soja, caldo infusão cérebro coração são comumente usados (Fishbern *et al.*, 1976; Holbrook *et al.*, 1980; Mehlman & Lovett, 1984a; Hitchins *et al.*, 1992; Hitchins *et al.*, 1995). O período de recuperação é curto, sendo geralmente não maior que quatro a seis horas à 35 - 37°C. Períodos maiores podem ser necessários quando as células estão severamente lesadas (Varnam & Evans, 1996).

Inúmeros meios líquidos são usados para enriquecimento seletivo de *Escherichia coli*. Os mais comumente usados são caldo EC e caldo lauril sulfato; que possuem agentes seletivos como verde brilhante e bile, e lauril sulfato de sódio respectivamente (Merck, 1994). Use-se ainda caldo MacConkey e caldo GN (Varnam & Evans, 1996). Numa variedade de métodos, as temperaturas elevadas de incubação de 41 a 45°C são recomendados na seqüência para aumentar a seletividade e reduzir o período de incubação. *Escherichia coli* O157:H7, conforme outras cepas de outros sorotipos, freqüentemente são incapazes de crescer em tais temperaturas, ou podem perder plasmídios virulentos, e se a temperatura elevada de incubação é usada, um segundo caldo de enriquecimento com incubação de 35 a 37°C é freqüentemente recomendado (Mehlman & Romero, 1982; Mehlman & Lovett, 1984b). Os meios tradicionais usados para o plaqueamento seletivo de *Escherichia coli* têm como base a lactose e agentes seletivos, os sais biliares e corantes, tais como o ágar MacConkey, ágar eosina azul de metileno e ágar bile vermelho violeta (Hitchins *et al.*, 1992; Merck, 1994; Hitchins *et al.*, 1995). Um meio alternativo é o ágar triptona bile que, mais recentemente, foi incorporado o substrato fluorogênico tetrametilumbeliferil- β -D-glucuronide para detecção de β -glucuronidase, como agente diferencial para *Escherichia coli*. Nenhum destes meios difere sorogrupos patogênicos de sorogrupos não patogênicos, embora meios e métodos específicos estão disponíveis para detecção do sorogrupo O157 (Varnam & Evans, 1996). Estes autores relatam que a fermentação da lactose, é a forma tradicional de diferenciar a *Escherichia coli* de membros da família *Enterobacteriaceae*, não fermentadores da lactose. A mais séria objeção no uso da fermentação da lactose como sistema diferencial, é a alta proporção de cepas patogênicas de *Escherichia coli* que falham na fermentação do açúcar. Em situações onde meios convencionais, deste tipo, são usados,

é prudente a seleção de ambas colônias não fermentadoras de lactose e fermentadoras para testes adicionais. Todavia, isto pode envolver teste de um grande número de colônias. Uma alternativa empregada é a substituição total ou parcial da lactose por outro açúcar, tal como glicose ou arabinose, porém, ainda assim haveria necessidade de testar um grande número de colônias.

A detecção da β -glucuronidase tem sido usada como método de diferenciação de *Escherichia coli* desde que a difusão do substrato fluorogênico seja eficaz como, por exemplo, o tetrametil umbeliferil- β -D-glucuronide (MUG) (Feng & Hartman, 1982). Este substrato é habitualmente combinado com o meio convencional. A atividade β -glucuronidase não é exclusiva para *Escherichia coli*, podendo ser produzida por algumas salmonelas, shigelas e yersinias. Reações falso positivas são produzidas por bactérias de deterioração quando presentes em grandes números, incluindo *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e outras bactérias Gram negativas. Além do sorotipo O157:H7 que não possui β -glucuronidase ativa (Kleanthous *et al.*, 1988), podem ocorrer outras cepas de *Escherichia coli* β -glucuronidase negativas. Segundo Chang *et al.* (1989), acima de 34% das *Escherichia coli* oriundas de fezes de pessoas saudáveis são negativas para glucuronidase, contudo isto, provavelmente, é de grande importância quando o teste é usado para determinar *Escherichia coli* como um organismo indicador. Embora a incorporação do MUG melhore a precisão do meio de plaqueamento seletivo para *Escherichia coli* há necessidade de prudência quanto à interpretação dos resultados finais (Varnam & Evans, 1996).

A substituição do MUG pelo substrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronide tem sido sugerida (Frampton *et al.*, 1988; Watkins *et al.*, 1988).

Venkateswaran *et al.* (1996), ao investigarem o isolamento de *Escherichia coli*, em produtos cárneos, com base na enzima- β -glucuronidase, consideraram-na eficaz e com margem de isolamento duas vezes maior do que a apresentada pelo ágar eosina azul de metileno.

Tomwsend *et al.* (1998), compararam o método Simplate para coliformes e *Escherichia coli* com outros diferentes métodos, utilizando inúmeras amostras de alimentos, inclusive carne suína e derivados, e concluíram que este método é uma alternativa mais adequada para determinação do NMP de coliformes e *Escherichia coli* em alimentos, sendo a indicação fenotípica e colorimétrica a mesma descrita por Adans *et al.* (1990) e AOAC (1995).

O sorotipo O157:H7 possui características fenotípicas que são utilizadas no desenvolvimento de meios seletivos para seu isolamento. MacConkey-sorbitol ágar foi desenvolvido para isolamento e identificação presuntiva deste sorotipo incapaz de fermentar o sorbitol em 24 horas (March & Ratmam, 1986; Kleanthous *et al.*, 1988; Aleksic *et al.* 1992; CDC, 2000). Szabo *et al.* (1986), formularam uma variante deste meio com a incorporação do MUG como uma segunda característica diferencial. Okrend *et al.* (1990), desenvolveram uma metodologia para isolamento do sorotipo O157:H7, em carne bovina moída, com base nas características fenotípicas do microrganismo, onde o meio de enriquecimento possui baixa concentração de sais biliares, adição de novobiocina, incubação à 37°C por seis horas, sob agitação, ou à 35°C por 24 horas, estática, procurando mostrar que algumas cepas de EHEC O157:H7 são incapazes de crescer em meio com alta concentração de bile sob 42°C.

A diferenciação da *Escherichia coli* de outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* é feita com base nos meios de plaqueamento seletivos e testes bioquímicos (Krieg *et al.*, 1984; Hitchins *et al.*, 1992; Holt *et al.*, 1994; Hitchins *et al.*, 1995; Varnam & Evans, 1996; Harrigan, 1998) e a diferenciação da *Escherichia coli* de outras espécies de *Escherichia* é determinada através de testes bioquímicos e sorológicos (Krieg *et al.*, 1984; Hitchins *et al.*, 1992; Holt *et al.*, 1994; Hitchins *et al.*, 1995; Varnam & Evans, 1996; Harrigan, 1998).

Determinadas propriedades são mais comuns entre cepas diarreiogênicas que entre a população geral de *Escherichia coli*, como a produção de verotoxinas pelo sorotipo O157:H7 (Doyle & Schoeni, 1984; Levine *et al.*, 1987; Samadpour *et al.*, 1990). Com a exceção de certas propriedades deste sorotipo, não é possível o uso destas propriedades como características fenotípicas, embora elas proporcionem valiosos conhecimentos para o microbiologista experiente. As dificuldades ocorridas no isolamento e identificação podem ser causadas pela tendência às propriedades atípicas (Varnam & Evans, 1996).

Por sua vez, Zadik *et al.* (1993) e Roberts *et al.* (1995) recomendam a ação combinada de cefixima, telurito de potássio como inibidora da microbiota indesejável, principalmente para, outras cepas de *Escherichia coli* e outras bactérias não fermentadoras de sorbitol e indicadoras da presença de *Escherichia coli* O157:H7, respectivamente, proporcionando a seleção de cepas verocitotoxigênicas, tendo como meio base o ágar MacConkey sorbitol.

A propriedade atípica comum em todos os tipos de *Escherichia coli*, diarreio gênicas, é a falha na fermentação da lactose. Geralmente aceita-se que cerca de 10% de todas as cepas de *Escherichia coli*, falham na fermentação da lactose (Ewing, 1972) e existe uma desproporcionalmente alta percentagem entre cepas patogênicas (Varnam & Evans, 1996). Não menos que 49% de sorotipos enteropatogênicos isolados de crianças com diarreia eram lactose negativa (Sakazaki *et al.*, 1967), enquanto a correspondente forma para cepas enteroinvasivas foi de 35% (Taylor *et al.*, 1988).

A falha na fermentação da lactose pode não ser um fenômeno absoluto. Em alguns casos, a fermentação é demorada e ocorre muito tarde para ser detectada durante a incubação rotineiramente empregada, embora em alguns casos a *Escherichia coli* seja capaz de fermentar a lactose à 37°C porém, não à 44°C (Varnam & Evans, 1996). Cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica sorogrupo O₄, lactose negativa e epidemiologicamente importante na Somália, têm sido motivo de pesquisa (Nicoletti *et al.*, 1988).

A produção de indol, a partir do triptofano, à 44°C, é freqüentemente considerada a mais segura propriedade que a fermentação da lactose (Anderson & Baird Parker, 1975). Embora acima de 99% de todas as cepas de *Escherichia coli* produzam indol, a percentagem de cepas que são negativas é alta entre os tipos patogênicos (Hartman *et al.*, 1986). Entretanto, a percentagem de cepas indol negativas parece ser significativamente menor do que as cepas lactose negativas. A produção de indol pode também ser dependente da temperatura, uma vez que algumas cepas são positivas à 37°C mas não à 44°C. Esta característica tende a ser associada com *Escherichia coli* O157:H7, porém, também ocorre entre outros tipos patogênicos. A incapacidade de crescer em temperaturas em torno de 44°C é uma outra característica do sorotipo O157:H7. Cepas de outros tipos diarreio gênicas podem ser isoladas, em baixa freqüência, em temperaturas às quais são sensíveis (Varnam & Evans, 1996). As cepas de EIEC demonstram propriedades atípicas adicionais em relação àquelas comuns a todos os tipos patogênicos. Em muitos casos, estas propriedades são comuns, estreitamente relacionados com *Shigella* ssp.. Uma alta proporção de cepas EIEC são imóveis, e muitas delas falham na produção de gás durante a fermentação de açúcar. Esta última propriedade não é exclusiva da EIEC, podendo ser encontrada em cepas patogênicas e em não patogênicas (Varnam & Evans, 1996). Isolamentos de EHEC, sorotipo O157:H7, têm apresentado três distintas propriedades que podem ser usadas no isolamento e diferenciação do sorotipo. A falha de fermentação do sorbitol é uma propriedade muito comum no sorotipo O157:H7 (March & Ratman, 1986;

Kleanthous *et al.*, 1988; Fratamico *et al.*, 1993), porém, relativamente rara entre outras cepas de *Escherichia coli*. As cepas do sorotipo O157:H7 também falham na produção de β -glucuronidase (Kleanthous *et al.*, 1988), sendo estas duas características exploradas como fatores diferenciais em meios de isolamento seletivo (Varnam & Evans, 1996). Uma propriedade menos conhecida deste sorotipo é a sensibilidade ao azul de bromotimol em alta temperatura de incubação que tem sido sugerida como base para o teste confirmativo (Gubash *et al.*, 1988). Outros possíveis marcadores bioquímicos para o sorotipo O157:H7 são falhos em produzir a descarboxilação da lisina e ornitina (Haldane *et al.*, 1986), e fermentação da rafinose e dulcitol (Ratman *et al.*, 1988).

A tipificação de *Escherichia coli* é feita através da sorotipagem em lâmina, placa ou mais comumente em tubo de aglutinação, podendo ser usada para detecção de sorogrupos patogênicos ou em investigações epidemiológicas. Os esquemas de sorotipagem são análogos àqueles para *Salmonella* spp. Três tipos de antígenos são encontrados; somático (O), capsular (K), flagelar (H). No esquema Kauffman-Knipschildt-Vahlne a subdivisão primária é feita de acordo com a antigenicidade da parede celular, antígeno O lipopolissacarídeo. Um sorogrupo é então definido pela presença das características do antígeno O, e pode então ser subdividido em sorotipos com base nos antígenos K e H. A necessidade da determinação dos antígenos K e H está na dependência do sorogrupo (Robins - Browne, 1987; Meng *et al.*, 2001; Bettelheim, 2002). Os antígenos flagelares H, estão relacionados com proteínas dos flagelos, e os antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares (Franco & Landgraf, 1996). O sorogrupo O55 é raramente encontrado em pessoas saudáveis, e pode ser considerado como patogênico se isolado de crianças com diarreia. Neste caso, a sorotipagem é totalmente desnecessária. Em contraste, o sorogrupo O86 é comumente encontrado em pessoas saudáveis e, se isolado, a sorotipagem é necessária uma vez que o sorotipo O86:H34 é patogênico (Varnam & Evans, 1996).

O estudo sorológico de amostras de *Escherichia coli*, utilizando-se todos os soros anti-O, anti-K e anti-H, somente é utilizado quando se procura conhecer a associação de sorogrupos e sorotipos com determinadas patologias e com outras condições ecológicas, sendo freqüente o uso de anti-soros preparados contra sorogrupos O de EPEC e EIEC (Campos & Trabuasi, 1999).

A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) é um método rápido, sensível e específico, freqüentemente usado para determinar a presença de patógenos em humanos,

bovinos e alimentos. Recentemente, numerosos grupos têm desenvolvido protocolos PCR multiplex usando dois ou mais pares de “primer” para aumentar a especificidade para identificação de *Escherichia coli* O157:H7, mantendo sua habilidade em detectar outros sorotipos (Franco & Landgraf, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Acheson & Jaeger, 1999). A designação PCR multiplex direta para STEC em geral e *Escherichia coli* O157:H7 especificamente, foi usada por Gannon *et al.* (1993). Estes pesquisadores determinaram dois pares de “primer” complementares de PCR para franquear regiões do gen *flic* cujos fragmentos amplificados de *Escherichia coli* O157:H7 foram testados, mas não das 49 cepas adicionais de *Escherichia coli* de outros tipos de H. Outro método direto aplicado frente *Escherichia coli* O157:H7 é a subtipagem para PCR que determina a amplificação de sequências de variáveis entre sequências repetidas. Paton & Paton (1998) desenvolveram dois métodos PCR multiplex para melhorar a detecção de STEC em fezes e alimentos. Acheson & Jaeger (1999) relatam que no primeiro método empregaram-se quatro pares de primer para *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* e *hlyA* (um plasmídio codificador da enterohemolisina), no segundo método foram usados dois pares de primer específico para a porção da região *rfb* (antígeno O) de *Escherichia coli* O157:H7 e O111, não sendo reconhecidos como causadores de surtos associados com diarreia sanguinolenta e SUH. Modificações na sequência do “primer” possibilitam a detecção de variantes *stx*₂ e a especificidade do “primer” antígeno O permitem a detecção de todas as cepas O157 e O111 testadas sem reação cruzada com a cepa O55, clonalmente relatada como EPEC.

2.11 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural das várias espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (Tavares, 1990).

O gênero *Escherichia* apresenta susceptibilidade à maioria dos antibióticos usados contra bactérias Gram negativas (Pelczar *et al.*, 1997). Em muitos casos as infecções por *Escherichia coli* diarreiogênica são autolimitantes e o tratamento se restringe à rehidratação e balanço eletrolítico, se necessário. A antibioticoterapia normalmente não é efetiva nem desejável, porém, é indicada quando a infecção é ocasionada por cepas EPEC aderentes, indutoras de diarreia persistente, por colocar a vida em risco e por serem severamente enteropatogênicas ao intestino delgado (Hill *et al.*, 1988). Neste caso, faz-se a

administração intravenosa de antibióticos incluindo gentamicina e trimoxazole (Thoren *et al.*, 1980). Entretanto, no caso de infecções por EHEC o tratamento com cotrimoxazole pode levar ao desenvolvimento da síndrome urêmica hemolítica (Pavia *et al.*, 1988; CDC, 2000).

Na produção animal, os antibióticos têm sido utilizados com duas finalidades principais, como aditivos em rações para maior desenvolvimento e conseqüentemente funcionando como promotores de crescimento; e prevenção ou tratamento de doenças específicas, administrados por via parenteral, oral ou misturados às rações (Valle, 1985). O uso de antibióticos de forma indireta e a longo prazo, devido à grande exposição de microrganismo a essas drogas, pode dar origem a seleção de cepas resistentes que poderá ser transferida entre bactérias (Tavares, 1990).

O conhecimento da existência de plasmídios e transposons é importante para a compreensão da resistência aos agentes antimicrobianos. Conforme Jawetz *et al.* (1995), o plasmídio, pequeno elemento genético capaz de se replicar, pode ser transferido de uma célula para outra, transmitindo uma informação genética pela população. Gomes *et al.* (1989) esclarecem que existem os chamados plasmídios R ou fatores R que possuem como principal característica a presença de genes de resistência para antimicrobianos, sendo a principal causa da resistência bacteriana. Ainda relatam que os transposons são pequenas moléculas de DNA que podem se inserir nos cromossomos ou plasmídios trocando de posição. Esses elementos codificam a síntese de enzimas de resistência aos antimicrobianos. Os transposons são elementos de transferência genética que contribuem para a distribuição de genes de resistência aos antibióticos em importantes grupos de bactérias responsáveis por casos clínicos severos (Salyers *et al.*, 1995; Bettelheim, 2002). As bactérias podem se tornar resistentes aos agentes antimicrobianos e Trabulsi & Toledo (1989); Salyers & Amabile-Cuevas (1997) esclarecem que a aquisição desta resistência é decorrente de uma alteração genética determinada por mutações cromossômicas ou por aquisição de plasmídios R. Os antibióticos não induzem a essa resistência, apenas selecionam as amostras resistentes (Tavares, 1990). Para Trabulsi & Toledo (1989); a origem de resistência às drogas pode ser genética ou não. A maioria dos microrganismos resistentes às drogas surge como resultado das alterações genéticas e subsequentes processos de seleção pelos agentes antimicrobianos. Uma transferência unilateral de material genético entre bactérias do mesmo gênero ou de gêneros diferentes ocorre durante o processo de conjugação. Esta transferência é mediada por um fator de fertilidade que

resulta na extensão de pilis sexuais da célula doadora para a receptora, sendo este o método mais comum de propagação de resistência aos múltiplos fármacos por meio de gêneros diferentes de bactérias Gram negativas.

Meng *et al.* (1998) relataram que o desenvolvimento de resistência pelas bactérias patogênicas é inevitável, em consequência do uso clínico das drogas antimicrobianas. O uso excessivo de antibióticos para o tratamento de doenças animais, a aplicação subterapêutica de agentes antimicrobianos para prevenção de doenças, promoção de crescimento e eficiência alimentar em animais de criação, têm acelerado a emergência das bactérias antibiótico-resistentes, que podem ser transferidas para humanos através da cadeia alimentar.

Piddock (1996), propôs três possíveis causas em que o uso dos antibióticos em alimentação animal pode por em risco a saúde humana: 1- bactérias antibiótico-resistentes patogênicas para humanos são selecionadas, e o alimento é contaminado durante o abate e/ou preparo. Quando o alimento é ingerido e a bactéria causa uma infecção que requer tratamento antibioticoterápico, o tratamento é comprometido. 2- bactérias antibiótico-resistentes não patogênicas para humanos são selecionadas no animal. Quando o alimento contaminado é ingerido, a bactéria transfere a resistência para outra bactéria no intestino humano. 3- Antibióticos permanecem como resíduos em produtos de origem animal, possibilitando a seleção de bactérias antibiótico-resistentes no consumo do alimento.

Scaletsky *et al.* (1982) investigando a resistência às drogas, de nove cepas de *Escherichia coli* isoladas de hambúrgueres, quibes e lingüiças frescas, concluíram que cinco linhagens mostraram-se sensíveis à sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, ampicilina, ácido nalidíxico e cloreto de mercúrio e três cepas foram resistentes a estreptomicina e tetraciclina, mostrando que os genes de resistência às drogas foram transferidas em todos os experimentos de conjugação e evidenciaram de que as características estudadas estão localizadas em plasmídios independentes.

Hill *et al.* (1985) estudaram a resistência antibiótica de cepas de *Escherichia coli* isoladas de embutidos de carne suína, concluíram que 70% delas se apresentaram resistentes a pelo menos um antibiótico dentre os estudados.

Franco *et al.* (1985) isolaram cepas enteropatogênicas em amostras de alimentos de origem animal e observaram que algumas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo a maioria sensível aos antimicrobianos estudados.

Ferreira *et al.* (1986a,b) pesquisaram a sensibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne moída e lingüiça frescal pelo método de concentração inibitória mínima (1) e pela difusão em meio sólido (2), e encontraram resultados discrepantes pois as cepas foram 100,0% sensíveis à cefoxitina e 100,0% resistentes nas respectivas técnicas sem no entanto estudarem fatores intervenientes. Estes inóculos foram 100% sensíveis ao cloranfenicol e cefoxitina e resistentes à penicilina, cefalotina, eritromicina, tianfenicol, rifampicina e cloranfenicol pelo método (1); e sensíveis ao cloranfenicol, kanamicina, cefalotina, tobramicina, gentamicina e nitrofurantoína; e resistentes a cefoxitina, lincomicina, penicilina, carbenicilina e oxacilina pelo método (2). Ferreira *et al.* (1996) estudaram a sensibilidade de *Escherichia coli* isoladas de carne moída, lingüiça e carne de rã, frente a antibióticos pelo método de difusão em placa encontrando sensibilidade para ciprofloxacina (94,8%), norfloxacina (91,6%) e tobramicina (87,7%) e resistência frente a carbenicilina (100,0%), eritromicina (91,0%), penicilina (90,3%), demonstrando maior sensibilidade às quinolonas de 2ª geração.

Meng *et al.* (1998) determinaram a resistência de 125 cepas de *Escherichia coli*, de dois diferentes sorotipos isolados de animais, alimentos e humanos concluíram que 30 (24,0%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico e 24(19,0%) resistentes a três ou mais antibióticos. Setenta por cento das cepas foram resistentes à estreptomina, sulfisoxazole e tetraciclina.

Radu *et al.* (1998) ao pesquisarem a resistência e sensibilidade de doze cepas de *Escherichia coli* O157:H7 e duas cepas correlatas isoladas de carne bovina, concluíram que nenhuma cepa mostrou antibiogramas idênticos e nas três repetições os resultados obtidos por cepa e para todos os antibióticos foram os mesmos.

Oliveira *et al.* (1999) concluíram que as amostras de *Escherichia coli* isoladas de hambúrgueres apresentaram 100% de resistência à eritromicina, rifampicina, carbenicilina e clindamicina e 100% sensíveis a metilmicina e gentamicina e com grandes variações entre os demais antibióticos quando utilizado o método difusão em placas com polidisco 24 – Victor Lorian.

Campos & Trabulsi (1999) advertiram: “sempre que for indicado o uso de antibiótico para infecções por EPEC, o antibiótico deve ser selecionado pelo antibiograma”, uma vez que os sorotipos mais frequentemente isolados são resistentes à maioria dos antibióticos.

2.12 ESTRATÉGIAS PARA PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES POR *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* ao ser detectada em um alimento pode indicar contaminação bacteriana de origem fecal, indicando condições higiênicas insatisfatórias; entretanto, diversas linhagens, são consideradas patogênicas para o Homem e animais com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia. Considerando-se as condições ecológicas da *Escherichia coli* e sua resistência às condições adversas, a sua eliminação total dos alimentos e prevenção das doenças pelas linhagens patogênicas, principalmente, o sorotipo O157:H7, representa um desafio. Em se tratando de *Escherichia coli* O157:H7, a sua pequena dose infectante combinada com a severidade da doença, significa que sucessivas estratégias preventivas são obrigatórias para redução dos focos ou eliminação da presença do microrganismo, sendo tradicionalmente aceitos os métodos de prevenção de crescimento do patógeno (CDC, 2000; Salmon, 2001). Estes focos são particularmente importantes para alimentos crus que podem não ser completamente cozidos antes do consumo (ex: carne moída) ou alimentos prontos para comer que não receberam tratamento definitivo que assegure a eliminação da *Escherichia coli* O157:H7 (ex: salsicha fermentada) (Buchanan & Doyle, 1997; CDC, 2000a; FSIS, 2000b).

A grande maioria dos microbiologistas de alimentos é unânime em afirmar que a produção de alimentos seguros tem como base o sistema “HACCP”. O conceito “HACCP” foi criado em 1971 por H.E. BAUMAN e outros cientistas da “Pillsbury Company”, em colaboração com a “National Aeronautics and Space Administration” (“NASA”) e com os Laboratórios de Pesquisas do Exército dos EUA, sendo dada a primeira conferência sobre a Proteção de Alimentos de Âmbito Nacional, em resposta aos requisitos de inocuidade para alimentos espaciais, impostos pela “NASA”. O conceito “HACCP” foi apresentado ao público pela primeira vez em 1971, onde foram divulgados os princípios básicos do sistema (Conference on Food Protection, 1971; National Conference on Food Protection, 1971). Era necessário garantir a seguridade dos alimentos quanto aos aspectos microbiológicos de patógenos e/ou toxinas evitando-se qualquer risco de toxinfecção para os astronautas. Além disso, era preciso eliminar possíveis partículas de alimentos que sob condições de gravidade zero, poderiam flutuar em cápsulas espaciais e assim interferir nos sofisticados circuitos eletrônicos. Os riscos de migalhas foram solucionados por meio de invólucros comestíveis, mas o caráter da inocuidade provou não ser seguro além de ser

dispendioso, uma vez que a análise do produto terminado não representava todo o lote e a quantidade de produtos analisados inutilizados encareciam o processo (Almeida, 1998).

O mesmo autor, ainda menciona que a "Food and Drug Administration - FDA" passou então a realizar as inspeções dos estabelecimentos produtores de alimentos baseando-se no sistema "HACCP" e elaborou um regulamento para os alimentos enlatados de baixa acidez e/ou acidificados. Apenas em 1985 é que o tema voltou a ter importância quando a "National Academy of Sciences" ("NAS"), dos Estados Unidos da América, publicou um relatório sobre critérios microbiológicos fazendo apologia ao sistema "HACCP". As recomendações formaram um Comitê específico para alimentos, o "National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods" (NACMCF), que em 1989 publicou um documento intitulado "Princípios "HACCP" para produção de alimentos". Subseqüentemente o Comitê "Codex Alimentarius" também elaborou um relatório com algumas modificações que incluíam árvores decisórias para determinação dos pontos críticos de controle. Em 1992, o NACMCF adotou então um novo documento onde incluía as recomendações do "Codex Alimentarius" e o publicou com a denominação de "Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Para o autor supra citado, o plano "HACCP" deve ser específico para cada alimento e deve haver descrição detalhada do alimento em questão incluindo ingredientes ou fórmula do produto, seu método de distribuição, condições de manutenção (refrigerado, congelado, etc.) e identificação do seu uso específico além do tipo de consumidores (gerais, idosos, dietéticos, etc.). Uma vez determinado o tipo de produto, deve ser feita a descrição simples e clara de todas as etapas do processamento do produto, em forma de diagrama de fluxo para, a partir deste, aplicar-se os sete princípios do sistema.

Segundo Loken (1998), os sete princípios do "HACCP" são baseados na Comissão do Codex Alimentarius (1993) e no NACMCF (1993), e são resumidos em:

- 1- Análise e perigos: a partir da elaboração do fluxograma do processo de produção com todas as etapas, desde a matéria prima até o produto final, lista-se todos os perigos que podem aparecer em cada etapa e descreve-se as medidas preventivas dos mesmos.
- 2- Pontos Críticos de Controle (PCC): a partir dos perigos e medidas preventivas descritos, decide-se em que pontos o controle é crítico para a seguridade do produto.
- 3- Limites Críticos: a partir das medidas de controle para cada PCC estabelece-se os limites críticos.
- 4- Monitoramento: descreve os critérios para monitorar os PCC.

5- Ação Corretiva: estabelece que tipo de ação corretiva que deve ser tomada quando houver desvio dos limites críticos.

6- Registro: estabelece a forma de registrar todos os controles (dados) que documentem o sistema "HACCP".

7- Verificação: estabelece a forma de verificar se o sistema está funcionando corretamente.

É importante ressaltar que no sistema "HACCP" há distintos sentidos para as palavras perigo e risco, onde risco é a estimativa da probabilidade de um perigo ou uma seqüência de perigos ocorrerem (Destro, 1997).

A Portaria nº 46 de 10 de Fevereiro de 1998, do Ministério de Agricultura e do Abastecimento, estabelece que há necessidade de adequação das atividades do Serviço de Inspeção Federal (SIF) aos modernos procedimentos adotados no controle higiênico sanitário das matérias primas e dos produtos de origem animal e considerando a necessidade de atender os compromissos internacionais assumidos no âmbito da Organização Mundial do Comércio e conseqüentes disposições do Codex Alimentarius, assim como no Mercosul, resolve:

No artigo 1º, instituir o Sistema de APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do SIF de acordo com o Manual Genérico de Procedimentos. No parágrafo 1º o SIF obedecerá um cronograma especialmente preparado e adotará os manuais específicos por produto e o de auditoria do sistema e no 2º, os manuais específicos por produto e o de auditoria do Sistema APPCC serão submetidos à consulta pública com o objetivo de receber sugestões por parte dos interessados, antes de serem aprovados pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA).

No artigo 2º, incumbir a SDA de instituir Comitês Técnicos com a finalidade de coordenar e orientar a execução das atividades de implantação do Sistema APPCC nos estabelecimentos de carne, leite, ovos, mel e produtos derivados, ficando covalidados os Comitês Técnicos Intersetoriais (CTI), anteriormente instituídos nos estabelecimentos de pescado e derivados (Brasil, 1998).

Modernamente, observa-se em todo o mundo um rápido desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos meios e métodos de detecção de agentes de natureza biológica, química e física causadores de moléstias nos seres humanos e nos animais, passíveis de veiculação pelo consumo de alimentos, motivo de preocupações de entidades

governamentais nacionais e internacionais voltadas à saúde pública. Ao mesmo tempo, avolumam-se as perdas de alimentos e matérias-primas em decorrência dos processos de deterioração de origem microbiológica, infestações por pragas e processamento industrial ineficaz, com severos prejuízos financeiros às indústrias de alimentos, à rede de distribuição e aos consumidores. Face a este contexto, às novas exigências sanitárias e aos requisitos de qualidade, ditados tanto pelo mercado interno quanto pelos principais mercados internacionais, o governo brasileiro, juntamente com a iniciativa privada, vem desenvolvendo, desde 1991, a implantação em caráter experimental o Sistema APPCC, do inglês “HACCP”. Este sistema é uma abordagem científica e sistemática para o controle do processo, elaborado para prevenir a ocorrência de problemas, assegurando que os controles são aplicados em determinadas etapas no sistema de produção de alimentos, onde possam ocorrer perigos e situações críticas.

O “HACCP”, hoje adotado pelos principais mercados mundiais, basicamente assegura que os produtos industrializados sejam elaborados sem risco à saúde pública, apresentem padrões uniformes de identidade e qualidade, atendam às legislações nacionais e internacionais, referentes aos aspectos sanitários de qualidade e de integridade econômica. Os sistemas tradicionais de Inspeção e Controle de Qualidade, face às necessidades de melhorarem seu desempenho quanto a eficiência, eficácia e relevância social na atividade de assegurar a qualidade dos alimentos, dentro de um sistema de gerenciamento da qualidade do processo industrial, passarão a utilizar como meio auxiliar esse sistema, que pela sua concepção e filosofia, além de assegurar os objetivos propostos, torna mais eficaz o SIF. Cabe destacar que o APPCC não é um sistema de inspeção. Destaca-se também a exigência dos Estados Unidos e da União Européia, em seus conceitos de equivalência de sistemas de inspeção, da aplicação de programas com base no Sistema APPCC. Nos Estados Unidos, o sistema foi tornado mandatário, a partir de janeiro de 1997, para as indústrias cárneas, com implantação gradativa. Entretanto, além de tratar de um mecanismo de prevenção e controle que atinge o segmento de industrialização dos produtos de origem animal, sua aplicação passa a ser imprescindível na reorientação dos programas nacionais da garantia da qualidade destes produtos para atendimento às exigências internacionais.

Os programas pretendem contribuir, de alguma forma clara e objetiva, com as indústrias de produtos de origem animal de grande, médio e pequeno porte, visando propiciar os benefícios do sistema de APPCC, que entendemos sejam os seguintes: conferir

um caráter preventivo às operações do processo de industrialização; orientar para uma atenção seletiva nos pontos críticos de controle; sistematizar e documentar os pontos críticos; garantir a produção de alimentos seguros; oferecer oportunidade de incrementar a produtividade e a competitividade. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento, através do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, dispõe-se a orientar o planejamento e a implantação dos planos de APPCC nas empresas que industrializam produtos de origem animal sob Inspeção Federal, determinando a produção de alimentos inócuos no aspecto microbiológico mediante as análises dos riscos das matérias primas, os riscos que podem aparecer ao longo da elaboração dos alimentos e os que se apresentam pelo mal uso dos mesmos até ao consumidor.

O sistema “HACCP” (APPCC) continua sendo a forma mais efetiva para a produção de alimentos seguros, que reduz o risco de infecções por EHEC. Contudo, EHEC constitui-se como um problema ímpar para o desenvolvimento e execução dos planos “HACCP”. A baixa ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos representa um ensaio microbiológico direto, para o patógeno, como forma de comprovar, com restrições, a eficácia do programa “HACCP”, pois a comprovação baseada nas análises microbiológicas depende do uso do organismo indicador apropriado que possibilite a avaliação rigorosa dos processos controladores e fatores associados com o risco de contaminação pela *Escherichia coli* O157:H7. O mais desejável é um processo que tenha ação letal para o patógeno, para reduzir os pontos críticos de controle assegurando a eficácia da ação e que previna a subsequente contaminação cruzada. Para produtos que não dependem de tratamento térmico para garantir um alimento seguro, por exemplo carnes fermentadas, a validade do processo integrado para alcançar o nível desejado de inativação, pode ser parte necessária de análise de perigos na fase de implantação do “HACCP” (APPCC) (Buchanan & Doyle, 1997). Estes autores ainda advertem que os planos “HACCP” (APPCC) que incluem ações para destruir patógenos são mais complexos, desde que o risco de redução do foco substitua o risco de eliminação. Tipicamente, existem um ou mais pontos críticos de controle associados com medidas que reduzem a probabilidade de acesso de patógenos ao produto ou que reduzem o número de patógenos, mas não os elimina. Desde de que tais processos não assegurem a completa ausência do patógeno, associa-se os pontos críticos de controle com a prevenção do crescimento do patógeno. Por exemplo, no plano genérico do “HACCP”(APPCC) para abate de bovino e fabricação desenvolvido pelo “National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods”

(NACMCF, 1993), inclui-se a *Escherichia coli* O157:H7 como perigosa. O plano “HACCP” (APPCC) relaciona a esfolagem, lavagem após a esfolagem, borrifagem bactericida, resfriamento e manutenção sob refrigeração como prováveis pontos críticos de controle. Em adição a estas atividades específicas ligadas ao abate, o Comitê indicou fatores associados com as práticas de produção animal, distribuição, comercialização e consumo do produto final, como um plano “HACCP” (APPCC) da fazenda à mesa do consumidor.

Um importante componente na aplicação do “HACCP” (APPCC) em produção animal (propriedade) é a redução da disseminação de *Escherichia coli* O157:H7 pelos animais. Duas tentativas, em potencial, são a exclusão competitiva e vacinação. A exclusão competitiva envolve o uso de culturas microbianas que competem com os patógenos na colonização dos nichos específicos. Esta tentativa da cultura bacteriana tem encontrado sucesso na notável redução da colonização de *Campylobacter jejuni* em aves (Schoeni & Doyle, 1992). A vacinação envolve a exposição do animal a um patógeno atenuado ou um antígeno do microrganismo virulento para produzir imunidade. Contudo, as tentativas de produção de vacinas tradicionais com a *Escherichia coli* O157:H7 não foram bem sucedidas. Recentes observações mostram que *Escherichia coli* O157:H7 não determina fixação e envolve lesões ou coloniza a superfície da mucosa do trato gastrointestinal (Brown *et al.*, 1997; Cray & Moon, 1995), e os bovinos expostos à *Escherichia coli* O157:H7 não são protegidos da reinfecção (Johnson *et al.* 1996). Conseqüentemente, pesquisas inovadoras são necessárias para conhecer-se a eficácia das vacinas (Buchanan & Doyle, 1997).

No abatedouro, semelhante às outras *Escherichia coli*, é suposto que a principal fonte de *Escherichia coli* O157:H7 em carcaças seja a contaminação fecal durante a produção animal e operações de abate. A contaminação fecal associada inicialmente com a contaminação da carcaça durante a esfolagem e a sua disseminação para outras carcaças pelos equipamentos e manipuladores, é preciso ser controlada (Dickson & Anderson, 1992).

Os procedimentos tradicionais de assepsia reduzem os níveis de *Escherichia coli* O157:H7 em áreas da carcaça com contaminação fecal visível (Hardin *et al.*, 1995). Várias alternativas para assepsia são pesquisadas para a remoção de patógenos entéricos. Estudos recentes com a *Escherichia coli* O157:H7 sugerem que a lavagem da superfície da carcaça com soluções de ácido acético a 1 – 2%, produz redução somente de um ciclo logarítmico de *Escherichia coli* O157:H7 em tecido magro; um efeito ligeiramente maior foi observado em tecido gorduroso (Dickson, 1991). A estocagem da carne por 24 horas

indicou apenas um pequeno efeito residual em carne magra, porém um substancial efeito sobre o tecido gorduroso. Inúmeros pesquisadores observaram diferenças na eficácia dos tratamentos com ácido entre carne magra e tecido gorduroso e entre diferentes porções das carcaças (Cutter & Siragusa, 1994; Fratamico *et al.*, 1996; Hardin *et al.*, 1995). Pesquisadores descobriram que a lavagem com ácido tinha pouco efeito na eliminação da *Escherichia coli* O157:H7 na superfície da carne (Brackett *et al.*, 1994; Fratamico *et al.*, 1996), possivelmente devido a dificuldade em remover a *Escherichia coli* O157:H7 da superfície de carcaça bovina previamente resfriada (Hardin *et al.*, 1995). A lavagem da pré evisceração reduz a subsequente aderência de *Escherichia coli* O157:H7 em carcaças bovinas (Dickson, 1995). O fosfato trissódico é avaliado como um agente sanitizante da superfície de carcaças e equipamentos. Sua eficácia é dependente do seu alto pH, como também da presença de ácidos orgânicos (Fratamico *et al.*, 1996). O fosfato trissódico pode aumentar a remoção da *Escherichia coli* O157:H7 das superfícies dos equipamentos (Somers *et al.*, 1994).

A vigilância continuada da Inspeção Federal, Estadual ou Municipal nos abatedouros frigoríficos e a facilidade em mobilizar rapidamente pesquisadores capacitados, são considerados partes fundamentais nos programas de segurança alimentar objetivando minimizar o impacto de novos microrganismos que ameaçam a saúde humana (Buchanan & Doyle, 1997; CDC, 2000c).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa foi desenvolvida, no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

3.2.1.1 Amostras

O desenvolvimento da pesquisa ocorreu em duas etapas, sendo a primeira representada pela detecção do agente etiológico (*Escherichia coli*) em amostras provenientes de suínos e o teste de sensibilidade dos sorogrupos frente a antimicrobianos. Na segunda etapa, a investigação concentrou-se em verificar a viabilidade experimental, dos diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* isolados, em lingüiça suína do tipo toscana.

Foram analisadas, após a divisão em meias carcaças, amostras de carne da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria; cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais); cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) (Figuras 1 e 2), linfonodos mesentéricos; e fezes da região íleo-ceco-cólica de suínos escolhidos aleatoriamente, abatidos na área do Grande Rio, em abatedouro frigorífico, sob a Inspeção Estadual, clinicamente saudáveis e julgados aptos para o

consumo após inspeção "ante e post - mortem", e provenientes dos estados do Rio de Janeiro (Magé e Rio Bonito), Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina.

As amostras anteriormente descritas foram colhidas assepticamente, sempre de um mesmo animal, após a divisão em meias carcaças, com exceção dos linfonodos mesentéricos e fezes que foram obtidas antes da divisão, em bolsas plásticas para "stomacher" esterilizadas e sacos "plastistéril", num total de 20 animais (100 amostras), identificadas, numeradas e transportadas sob refrigeração (em caixa isotérmica sob ação indireta do gelo) ao laboratório onde foram mantidas congeladas a -18°C , em conformidade com o armazenamento das carnes suínas, até o momento em que foram descongeladas "over night", em geladeira, a 2°C para serem analisadas bacteriologicamente. Dos diferentes pontos de obtenção das amostras, somente foram semeadas subamostras da parte carnosa, pois a parte gordurosa sempre foi retirada assepticamente, através de bisturis e lâminas esterilizadas e descartáveis. No caso dos linfonodos houve a total separação do "epíplon" e gordura. O número representativo das amostras satisfaz as exigências de amostragem para diagnóstico analítico, em conformidade com o método de amostragem previamente descrito (Di giacomo & Koepsell, 1986; Martin et al., 1987) tendo em vista que a prevalência de *Escherichia coli* em carne suína e derivados vem apresentando variação de 23,3% a 65,0% conforme demonstrado por Smith (1961, 1965), Calderon & Furlanetto (1990), Fuzihara & Franco (1993), Franco & Chaves (1997), Bersot *et al.* (1998) e Laubach *et al.* (1998).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Controle de qualidade dos meios de cultura

Todos os meios de cultura, quer sejam desidratados, oriundos de laboratórios comerciais, quer sejam os confeccionados no laboratório da Instituição, usados nas diferentes fases das análises bacteriológicas, que serão mencionados no momento adequado, após a esterilização em autoclave (conforme as especificações e exigências das técnicas) foram incubados em estufa bacteriológica "thermolyne-type 42000" a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e em banho maria eletrônico "polyscience - digital temperature controller" à 44°C por 24 horas, e estufa camisa dupla, com água, marca Fanem, modelo 057 à $44,5^{\circ}\text{C}$

por 24 horas, para verificar a eficiência no preparo e esterilização dos meios (prova de esterilidade).

Os meios de cultura foram confeccionados em quantidades suficientes para o uso durante uma semana.

Com o intuito de observar o real comportamento dos microrganismos e testar a eficácia de todos os meios de cultura utilizados nas diferentes fases, estes foram semeados com culturas padrões reconhecidas por órgãos internacionais, quais sejam: *Escherichia coli* INCQS 00312 - origem UFF/NCIB-86, *Escherichia coli* INCQS 00127 - origem ATCC 10799, *Escherichia coli* INCQS 00046 - origem ATCC 11303, *Escherichia coli* INCQS 00179 - origem CDC H27, *Escherichia coli* INCQS 00181 - origem CDC 055, *Escherichia coli* O157:H7 E-40705-SH₁-PHLS e cepas isoladas de pesquisas em produtos de origem animal no laboratório, identificadas como *Escherichia coli* tipo I.

3.2.2.2 Obtenção e preparo das subamostras em laboratório

No interior da câmara asséptica, após sanitização da superfície da bancada com etanol a 70%, cada embalagem (bolsa ou saco) foi aberta com assepsia, sendo os diferentes tipos de amostras fragmentadas nas mesmas condições, colocadas em placas de Petri 100 X 15 mm esterilizadas em forno Pasteur à 170°C por uma hora e pesadas, na zona de segurança do bico de Bunsen, na balança Marte Tríplice escala Record (Messer *et al.*, 1992).

3.2.2.3 Análises bacteriológicas

Em cada uma das fases das diferentes técnicas bacteriológicas empregadas, foram confeccionadas lâminas para verificar as características morfotintoriais do microrganismo pesquisado (bastonetes Gram negativo = BGN) pela bacterioscopia de imersão.

3.2.2.3.1 Enumeração de coliformes (Hitchins *et al.*, 1995; Kornacki & Johnson, 2001) – Método 1

Esta metodologia foi usada nas amostras de carne da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria, da cavidade torácica entre 4^a e 7^a costelas (pleura e músculos intercostais), e da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) por estar em concordância com o protocolo dos padrões microbiológicos de identidade e qualidade vigentes (Brasil, 2001). A metodologia é usada para todos os produtos de origem animal que possuem padrões para coliformes e/ou *E.coli*, porém, não há padrão, destes microrganismos, especificamente, para carnes suínas.

A- Teste presuntivo

O peso padrão das porções analíticas de subamostras de alimentos a serem investigadas quanto à sanidade e à presença de *Escherichia coli* é de 25 gramas, cada amostra foi pesada assepticamente como descrito em 3.2.2.2, colocadas em bolsa plástica para "stomacher", esterilizada e adicionadas de 225mL de Solução Fosfatada Tamponada (SFT) de Butterfield, sendo homogeneizadas em "stomacher 80 - Laboratory blender - seward", em baixa rotação durante dois minutos, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Para obtenção das diluições decimais 10^{-2} e 10^{-3} , foram utilizados 90mL de SFT de Butterfield acrescidos de 10mL da diluição anterior. Estas diluições foram homogeneizadas 25 vezes num arco de 30cm por sete segundos. Nunca foram usadas pipetas para distribuir volumes menores que 10% do seu volume total. Porções de 1mL foram transferidas para cinco tubos, contendo 10mL de Caldo Lauril Sulfato "CLS" (Merck n° 1.10266) e um tubo de Durham invertido no interior de cada tubo, para cada diluição para as três diluições consecutivas. O tempo entre o preparo da amostra e a inoculação no meio não foi superior a 15 minutos. Os tubos de fermentação foram incubados por 48 ± 2 h à 35°C , sendo verificados a cada 24 ± 2 h para presença de gás, como resultado da fermentação da lactose, através do deslocamento do tubo de Durham no meio e/ou efervescência quando o tubo era gentilmente agitado. Os tubos negativos foram reincubados por mais 24h, procedendo-se um segundo exame para produção de gás. A partir dos tubos positivos (com produção de gás) efetuou-se o teste confirmativo.

B- Teste confirmativo

O subcultivo de cada tubo positivo de CLS foi suavemente homogeneizado e com uma alça de platina de 3mm de diâmetro, transferiu-se o inóculo para o tubo de

fermentação contendo 10mL de Caldo Verde Brilhante Bile Lactose "VBBL" (Merck n° 1.05454) e um tubo de Durham invertido, incubando-os até 48±2h à 35°C. Analisou-se a produção de gás conforme anteriormente descrito, registrando-se os tubos positivos de cada diluição a partir dos quais foi calculado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais por grama da amostra, conforme Tabela 12 (Peeler *et al.*, 1992).

C- Teste completo

O subcultivo de cada tubo positivo do teste confirmativo, foi estriado, após suavemente homogeneizado, através de alça de platina de 3mm de diâmetro, em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno Lactose (Merck n° 1.01342) incubando-as invertidas, por 18 - 24h à 35°C. As colônias típicas e suspeitas de *Escherichia coli*, tendo como características morfocoloniais colônias planas, centro escuro, com ou sem brilho verde metálico, foram transferidas para Ágar Padrão para Contagem (Merck n° 1.05463) inclinado e em tubos de fermentação contendo caldo lactosado (Merck n° 1.07661) e um tubo de Durham invertido, encubados por 18 - 24h à 35°C. Nos tubos de fermentação foi verificada a produção de gás e dos tubos de ágar inclinado com crescimento, confeccionaram-se esfregaços em lâminas que eram coradas pelo método de Gram modificado por Hucker (Bier, 1976), procedendo-se a bacterioscopia por imersão para verificar-se a presença de BGN, característica morfo tintorial.

3.2.2.3.2 Seleção dos cultivos e identificação de isolamentos de *Escherichia coli* e sorotipagem

Os subcultivos citados anteriormente foram selecionados em meio SIM (Merck n° 1.05470) com incubação a 35 - 37°C por 24 - 48h para verificar-se a produção de sulfeto (H₂S), indol, motilidade; sendo separados os cultivos que apresentaram a formação de H₂S, considerando-se suspeitos de serem *Escherichia coli* aqueles que foram H₂S negativo, indol positivo, motilidade positiva ou negativa (Krieg *et al.*, 1984). Os isolamentos com este perfil foram identificados após incubação à 35 - 37°C por 24 - 48h conforme descrito por Toledo *et al.* (1982, a, b), empregando-se os meios de cultura EPM (PROBAC), MILI

(PROBAC) e Ágar Citrato de Simmons (Merck nº 1.02501). No meio EPM foram observadas a produção de ácido e/ou gás a partir da glicose, a produção de H₂S, l-triptofano desaminase e urease (Figura 14). No meio MILI observou-se a mobilidade, produção de indol e l-lisina descarboxilase (Figuras 15, 16 e 19). No meio Agar Citrato de Simmons verificou-se a utilização do citrato como única fonte de carbono.

Em conformidade com Krieg *et al.* (1984), foram procedidas ainda as seguintes provas bioquímicas complementares com incubações conforme descritas anteriormente. A- Vermelho de Metila, sendo usado o Caldo MR-VP (Merck nº 1.05712) para verificar-se a produção de íons hidrogênio, produção de ácido (pH<4,4) a partir da fermentação da glicose, evidenciado pela adição de cinco gotas da solução do indicador vermelho de metila (Thatcher & Clark, 1973). O aparecimento de distinta cor vermelha caracterizou positividade e cor amarela, resultado negativo (Figura 20). B- Voges Proskauer, no meio Caldo MR-VP (Merck nº 1.05712) verificou-se a produção de acetoína (acetil metil carbinol), 2,3 butanodiol ou diacetil a partir da metabolização da glicose. A presença destes metabólitos foi evidenciada pela adição de 0,6mL da solução alcoólica de alfa naftol 5% e 0,2 mL da solução aquosa de hidróxido de potássio à 40% (Thatcher & Clark, 1973). O desenvolvimento de cor rosa avermelhada em até duas horas constitui o teste positivo e cor amarela prova negativa (Figura 20). C- Oxidação e fermentação do sorbitol, do manitol e da celobiose foi usado OF Basal Medium seg Hugh and Leifson (Merck nº 1.10282) suplementando com 1% de sorbitol (Merck 1.07759), manitol (Merck 1.05982), celobiose (Riedel nº 39316), separadamente, semeados em duplicata, sendo que em um dos tubos a superfície do meio era coberta com uma camada de aproximadamente 1,5cm de óleo mineral esterilizado. O aparecimento de coloração amarela nos dois tubos significa a degradação dos carboidratos por fermentação e o aparecimento da coloração apenas no tubo sem óleo mineral indicativa a quebra dos carboidratos por oxidação (Figuras 17 e 18). D- Teste da ornitina descarboxilase, foi usado o Ornitina Descarboxilase Arginina Dihidrolase Teste Caldo Base (Merck nº 1.06934) suplementado com 0,5% de l-ornitina (Merck nº 1.06906), sendo os tubos desaerados imediatamente antes do uso. A superfície do meio foi coberta com uma camada de aproximadamente 1,5cm de óleo mineral esterilizado. As culturas fermentativas inicialmente fermentavam a glicose provocando a viragem ácida do meio de púrpura para amarelo. Posteriormente, se ocorresse a descarboxilação da ornitina, os produtos alcalinos dessa reação neutralizavam a reação ácida anterior, revertendo a cor do meio para púrpura. A não reversão da reação ácida

indica teste negativo. Neste teste também foi semeado, conforme anteriormente, o tubo controle que possuía apenas o meio base tornando-se amarelo ao final da incubação, devido na ausência do aminoácido (Figura 17).

Os subcultivos selecionados no meio SIM também foram triados em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Merck 1.03915) por picada na base e estrias no bisel, objetivando-se confirmar a não produção de H₂S, fermentação da glicose, e da lactose, apresentando a base e bisel amarelos, pela viragem do indicador vermelho de fenol devido à produção de ácido e afastamento e/ou rachaduras na base do meio em função da produção de gás (Figura 17).

As características fenotípicas (comportamento bioquímico) consideradas próprias e típicas de *Escherichia coli* foram: No meio EPM positivo para produção de ácido e gás a partir da fermentação da glicose e negativo para produção de H₂S, l-triptofano desaminase e urease; no meio MILI positivo em todos os testes e ausência de crescimento no meio Agar Citrato de Simmons. Vermelho de metila positivo, Voges Proskauer negativo, oxidação e fermentação do sorbitol (positivo ou negativo), oxidação e fermentação do manitol (positivo), oxidação e fermentação da celobiose (negativo), descarboxilação da l-ornitina (positivo ou negativo) e no meio Ágar Tríplice Açúcar Ferro, base e bisel ácidos com ou sem produção de gás e ausência de H₂S. Foram admitidos como resultados atípicos para *Escherichia coli* nos meios EPM e MILI, as seguintes características: testes negativos para a produção de gás a partir da glicose e mobilidade, produção de indol, e de l-lisina descarboxilase, respectivamente, entretanto, as colônias motilidade negativas também foram estocadas.

As colônias que apresentaram as características acima mencionadas, foram estocadas em ágar semi-sólido à temperatura de 5°C, em meio SIM (Merck nº 1.05470) à 5°C e em caldo Infusão Cérebro Coração (Merck nº 1.10493) com 20% de glicerol (Reagen) à temperatura de -20°C, para em seguida serem sorotipadas.

Todas as colônias de *Escherichia coli* foram sorotipadas para a investigação daquelas pertencentes ao grupo das *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC - O157)

Ênfase foi dada às colônias negativas para a produção de l-lisina descarboxilase, móveis ou não, em serem sorotipadas para a investigação às pertencentes ao grupo das EIEC, utilizando-se antisoros polivalentes da Probac do Brasil Ltda.

Os soros polivalentes de EPEC contém anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Poli A - O26, O55, O11 e O119; Poli B - O114, O125, O142 e O158 e Poli C - O86, O126, O127 e O128.

Os soros polivalentes para EIEC contém anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Poli A: O28ac, O29, O136, O144 e O152; e Poli B - O112ac, O124, O143, O164 e O167.

Soro anti *Escherichia coli* O157 (EHEC).

Todas colônias positivas na soroaglutinação com os anti-soros polivalentes foram testados com os anti-soros monovalentes correspondentes. Para a soroaglutinação em placa com anti-soros poli e monovalentes seguiu-se a metodologia descrita por Ewing (1986). O antígeno utilizado para o teste foi a suspensão bacteriana obtida com cerca de 0,3mL de solução salina esterilizada adicionada a uma cultura bacteriana de 18-24 horas à 35°C em Ágar Caso ("Tryptic soy" ágar) (Merck nº 1.05458) inclinado, tendo-se o cuidado de testar, anteriormente, se o soro era autoaglutinante, utilizando-se uma gota do soro e uma gota de solução salina, para verificar a não ocorrência de aglutinação (controle).

A confirmação bioquímica dos isolados foi verificada pelo sistema API20 E utilizado conforme especificação do fabricante.

3.2.2.3.3 *Enumeração de coliformes fecais* (Hitchins *et al.*, 1995; Kornacki & Johnson, 2001) – Método 1

Os tubos positivos do teste presuntivo para o NMP de coliformes totais foram transferidos, com alça, para tubos contendo 10mL de Caldo EC (Merck nº 1.10765) e um tubo de Durhan invertido, incubando-os a 48 ± 2 h à $45,5^\circ\text{C} \pm 0,2$ em banho maria eletrônico "Polyscience - digital temperature controller". Sendo examinados para a produção de gás após 24 ± 2 h; quando negativos, eram reincubados até 48 ± 2 h. A partir dos tubos positivos de cada diluição foi calculado o NMP de coliformes fecais por grama de amostra, conforme Tabela nº 12 (Peeler *et al.*, 1992), confirmando-se o NMP de coliformes fecais.

O subcultivo de cada tubo gás positivo, foi suavemente homogeneizado e estriado em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno Lactose (Merck nº 1.01342) incubando-as invertidas por 18-24h a 35°C. As UFC típicas e suspeitas de *Escherichia coli* foram transferidas para Agar Padrão para Contagem (Merck 1.05463) inclinado e em tubos de fermentação contendo caldo lactosado (Merck nº 1.07661), incubando-os por 18-24h à 35°C, para verificar-se as características morfotintórias (BGN) após confecção de lâmina e

coloração pelo método Gram modificado por Hucker e para verificar produção de gás, confirmando-se o NMP de *Escherichia coli*. Os cultivos com tais características foram selecionados e biotipificados para *Escherichia coli* conforme descrito em 3.2.2.3.2.

3.2.2.3.4 Método SimplateTM para coliformes totais e *Escherichia coli* (Townsend *et al.*, 1996) – Método 2

Esta metodologia foi usada em amostras de carne da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria; da cavidade torácica entre 4^a e 7^a costelas (pleura e músculos intercostais) e da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda).

O peso padrão das porções analíticas de cada unidade amostral foi de 25 gramas, sendo pesada assepticamente como descrita em 3.2.2.2; colocadas em bolsa plástica para "stomacher" esterilizada e adicionadas de 225mL de SFT de Butterfield, homogeneizadas em "stomacher 80 - laboratory blender - seward", em baixa rotação por dois minutos.

Cada frasco contendo o meio SimplateTM desidratado para coliformes totais e *Escherichia coli*, foi dispensado em frasco contendo 100mL de água destilada esterilizada que, depois de fechado, foi homogeneizado para total dissolução e reconstituição do meio. A tampa da base da placa do Simplate foi removida em condições de esterilidade, sendo dois mililitros do homogeneizado vertidos na plataforma central da base da placa e imediatamente foram adicionados 10mL do meio para coliformes totais e *Escherichia coli*. A tampa da placa foi recolocada, certificando-se que o recorte lateral da tampa não coincidissem com o escoadouro da lateral da base para o não derramamento do meio. O conteúdo da placa (homogeneizado + meio) foi distribuído uniformemente pelas concavidades girando-se gentilmente a placa no sentido horário e anti-horário. Em seguida a base da placa foi impactada sobre a bancada, para provocar a liberação de alguma bolha de ar que eventualmente tivesse ficado presa no fundo das concavidades. O recorte na lateral da tampa foi alinhado com o escoadouro da lateral da base da placa e cuidadosamente escorria-se o excesso do conteúdo que não se acomodasse nas concavidades existentes na placa, mantendo-se a placa do Simplate num ângulo de aproximadamente noventa graus da bancada de trabalho, sendo o excesso descartado em condições de esterilidade apropriadas. Acomodou-se o recorte da tampa ao longe do escoadouro da base da placa antes de proceder à incubação da amostra evitando-se desta

forma o ressecamento do meio e da amostra durante o período de incubação. Cada placa foi incubada invertida por 24 horas à 37°C. Após este período, as concavidades coloridas (do laranja ao vermelho) foram contadas e consideradas positivas para coliformes totais. Paralelamente, a placa foi exposta à radiação ultravioleta (6W, 365nm) a uma distância de 15 - 30cm, para contagem das concavidades fluorescentes consideradas positivas para *Escherichia coli*. As concavidades coloridas que não fluoresciam foram positivas para coliformes totais, porém negativas para *Escherichia coli*. As placas usadas foram para contagem normal e possuíam 84 concavidades. Quando ocorria um alto número de concavidades fluorescentes, para o seu cálculo, subtraía-se o número total de concavidades existentes na placa pelo número de concavidades não fluorescentes. O número de concavidades coloridas e o número de concavidades fluorescentes foi comparado com a tabela de NMP (Tabela 13) para obter-se o NMP de coliformes totais e *Escherichia coli*, respectivamente.

O meio Simplate™ para coliformes totais e *Escherichia coli* (CEc) é usado para detectar e quantificar os coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos é baseado em "Defined Substrate Technology (DST) licenciado pela IDEXX Laboratories (patent n° 4925789)", que correlaciona a presença das enzimas beta galactosidase, e beta glucuronidase para a presença de coliformes totais e *Escherichia coli*, respectivamente. O meio CEC é especificamente formulado para favorecer o crescimento e detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* após somente 24 horas de incubação, sendo mais fácil a leitura e contagem do que todos os métodos comumente usados, segundo Townsend *et al.* 1996.

A detecção de coliformes totais ocorre quando o componente vermelho de clorofenol-β-D-galactopiranosídeo (CPRG) é hidrolisado pela enzima β-galactosidase, liberando a molécula de vermelho de clorofenol (CPR) que varia da cor laranja claro ao vermelho escuro. A detecção da *Escherichia coli* ocorre quando o componente tetrametilumbeliferil β-D-glucuronide (MUG) é hidrolisado pela enzima β-glucuronidase e libera a molécula azul fluorescente de tetra metilumbeliferona (4-MU). Esta cor pode ser visualizada a olho nu quando sob luz ultravioleta de 365 - 366nm (Figuras 21 e 22).

3.2.2.3.5 Isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7 (Merck, 1996) – Método 3

O método analítico aqui discriminado foi aplicado em amostras de carne da região interna da: papada correspondente à área de ferida de sangria; cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais); cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda); linfonodos mesentéricos; e fezes da região íleo-ceco-cólica, cuja obtenção e o preparo das subamostras conforme em 3.2.2.2. O preparo do inóculo teve como pesagem, assepticamente, 25 gramas de cada tipo de amostra que foram acondicionadas em bolsa plástica para "stomacher", esterilizada e adicionadas de 225mL de caldo Lauril Sulfato (Merck nº 1.10266) sendo homogeneizadas em "stomacher - 80 laboratory blender - seward", em baixa rotação por dois minutos. O homogeneizado foi vertido assepticamente no frasco original que continha o meio de cultura, e incubado por 24 horas à 37°C (Figuras 3 e 6). Foram semeados 0,1mL do subcultivo crescido no caldo, na superfície de Agar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult (Merck nº 1.04036) em placas de modo a obter colônias isoladas, incubando-se as placas por 24 horas à 37°C. As colônias sorbitol negativas ou positivas foram analisadas mediante uma lâmpada Ultra Violeta (UV) de comprimento de onda de 366nm (fonte de luz UV para microbiologia - Merck nº 13203), com referência à formação de fluorescência. As colônias sorbitol negativas ou positivas, com ou sem fluorescência e isoladas, foram identificadas por biotipificação e testes sorológicos conforme descritos em 3.2.2.3.2.

O Ágar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult possui desoxicolato de sódio que inibe grande parte de crescimento da microbiota Gram positiva. O sorbitol juntamente com o indicador de pH azul de bromotimol determina a degradação do carboidrato (álcool), que em caso de microrganismos sorbitol positivos resultam colônias com halo amarelado em torno. Cepas sorbitol negativas não determinam a troca de cor do meio de cultura e desenvolvem colônias de coloração esverdeada. O tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal resultam em descoloração parda enegrecida do meio pela presença de colônias de patógenos formadores de sulfito de hidrogênio pela precipitação de sulfito de ferro. O *Proteus mirabilis* em particular, que exhibe propriedades bioquímicas semelhantes àquelas da *Escherichia coli* O157:H7, pode ser facilmente diferenciado da *Escherichia coli* O157:H7 devido à descoloração parda enegrecida. O tetrametilumbeliferil β-D-glucuronide (MUG) é transformado em tetrametilumbeliferona pelos patógenos produtores de β-D-glucuronidase; tetrametilumbeliferona fluoresce sob radiação com luz UV: a atividade da β-D-glucuronidase é uma característica altamente específica da *Escherichia*

coli. Em contraste com a maioria das cepas de *Escherichia coli*, a *Escherichia coli* O157:H7 não é capaz de produzir a β -D-glucuronidase, logo, quando irradiada com luz UV não determina a fluorescência.

Segundo Merck (1996), o Ágar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult é seletivo para isolar e diferenciar cepas enterohemorrágicas (EHEC) de *Escherichia coli* O157:H7, procedentes de alimentos e amostras clínicas.

3.2.2.3.6 Pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica (Mehlman & Lovett, 1984c) com modificações – Método 4

A- Preparo do inóculo e enriquecimento não seletivo

As amostras analisadas foram as mesmas referidas no subitem 3.2.2.3.5, cuja obtenção e preparo das subamostras ocorreram conforme descrito em 3.2.2.2., enquanto que a pesagem e homogeneização também foram descritas anteriormente, em 3.2.2.3.5, utilizando-se 225mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI - Merck nº 1.10493) (Figura 4). O homogeneizado foi transferido para um frasco Erlenmeyer de capacidade de 500mL e incubado por três horas à 35°C para a recuperação das células injuriadas.

B- Semeadura direta

Após o período de recuperação, o subcultivo crescido em Caldo BHI (Merck nº 1.10493) foi semeado por esgotamento em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno Lactose seg Levine - Levine EMB Ágar (Merck nº 1.01342) (Figura 8), Ágar MacConkey Lactose (Merck nº 1.05465) (Figura 7), Ágar MacConkey Sorbitol (Difco nº 0079) (Figura 9), Ágar Telurito Cefixima Sorbitol MacConkey (Ágar TC - SMAC) (Figura 10) (Zadik *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1995), Ágar *Escherichia coli* O157:H7 Fluorocult (Merck nº 1.04036) (Figura 11) e Ágar "Hemorrhagic colitis"(HC) (Szabo *et al.*, 1986) isento de MUG (Figura 12 e 13). Sendo todos os meios incubados por 18 - 24 horas à

35°C. O meio HC foi incubado em duplicata, pois, nele, também se utilizou a temperatura de 44,5°C no mesmo período indicado anteriormente.

C- Enriquecimento para isolar *Escherichia coli* enteropatogênica

Após o período de enriquecimento não seletivo (A), 100mL do subcultivo de cada tipo de amostra foram transferidos assepticamente para um frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de Caldo Triptona Fosfato (TP) (Vanderzant & Splittstoesser, 1992) em dupla concentração (2N), sendo então incubados à 44°C ± 0,2°C por 20 horas, em estufa de camisa dupla (Figura 5).

D- Semeadura após enriquecimento

Após o período de incubação, o subcultivo crescido no Caldo TP-2N foi semeado nos mesmos meios utilizados na semeadura direta, incubando-se da mesma forma descrita em 3.2.2.3.6.B.

E- Seleção das colônias de *Escherichia coli*

Devido à variedade de biotipos enteropatogênicos de *Escherichia coli* foram selecionadas três colônias típicas e três colônias atípicas de cada um dos meios de plaqueamento, onde ocorreram crescimentos.

F- Identificação de *Escherichia coli*

A biotipificação foi efetuada como descrita em 3.2.2.3.2.

A tabela a seguir apresenta as características bioquímicas identificáveis da *Escherichia coli*.

Características bioquímicas identificáveis da *Escherichia coli*

CEPAS CARACTERÍSTICAS	<i>E. coli</i> TÍPICA	<i>E. coli</i> INVASORA	<i>E. coli</i> CLÁSSICA ENTEROPATOGÊNICA	<i>E. coli</i> O157:H7
GAS	+	+/-	+/-	+/-
LACTOSE	+	+/-	+	+
GLICOSE	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-
I-TRIPTOFANO DESAMINASE	-	-	-	-
UREASE	-	-	-	-
MOTILIDADE	[+]	-	+/-	+/-
INDOL	+	+	+	+
I-LISINA DESCARBOXILASE	[+]	-	+	+
CITRATO	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
O/F SORBITOL	+	+	+	-
O/F MANITOL	+	+	+	+
O/F CELOBIOSE	-	-	-	-
I-ORNITINA DESCARBOXILASE	d	+/-	+/-	+

O/F = oxidação e fermentação + = reação ou crescimento positivos - = reação ou crescimento negativos [+] = 76% - 89% das cepas são positivas **d** = 26% - 75% das cepas são positivas

FONTES: Dados adaptados de Brenner (1984), Hitchins et al. (1992), Meng et al. (2001), Probac do Brasil (1998) e Silva *et al.* (1997).

G- Manutenção das UFC de *Escherichia coli* e sorotipagem foram procedidas segundo 3.2.2.3.2.

3.2.2.3.7 Teste de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) multiplex

A colônia sorotipada como EHEC foi testada para PCR, utilizando-se PCR multiplex para os genes “shiga toxin” *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* sendo PCR₁ segundo China *et al.* (1996) e PCR₂ segundo Paton & Paton (1998) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo realizada gentilmente, pela Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzales, usando-se a amostra de *Escherichia coli* K-12DH5 α como controle negativo e as amostras *Escherichia coli* E40705 (O157:H7, *stx*₁/*eaeA*) e *Escherichia coli* E30138 (O157:H7, *stx*₂/*eaeA*) como controles positivos, sendo estas oriundas da CPHL-UK.

Segundo a Dra. Alice Gonçalves, para a amplificação dos genes que codificam a subunidade A de *stx*₁, a subunidade A *stx*₂ (incluindo as variantes conhecidas de *stx*₂) e a região do gene que codifica *eaeA*, foram utilizados os “primers” descritos originalmente por China, Pirson & Mainil (1996). Estes “primers” foram originalmente denominados *stx*₁-F(5’ AGA GCG ATG TTA CGG TTT G 3’) e *stx*₁-R(5’ TTG CCC CCA GAG TGG ATG 3’); *stx*₂-F(5’ TGG GTT TTT CTT CGG TAT C3’); *stx*₂-R (5’ GAC ATT CTG GAC TCT CTT 3’) e EP₁(5’ AGG CTT CGT CAC AGT TG 3’) e EP₂ (5’ CCA TCG TCA CCA GAG GA 3’) para *eaeA*. O produto da amplificação da seqüência *stx*₁ consiste em um fragmento de DNA com peso molecular de 388 pb, da seqüência *stx*₂ em fragmento de 807 pb da seqüência *eaeA* em fragmento de 570 pb. A análise dos fragmentos amplificados procedeu –se em eletroforese, em gel agarose a 1,8% por 50 minutos em 130v/130mA, com brometo de etídeo (5mg/mL). Para aumentar a densidade do DNA, facilitar a dispersão das bandas e acompanhamento da corrida acrescentou-se o corante azul de bromofenol, Observaram-se os brancos em aparelho transiluminador e fotografaram-se as bandas em câmara polaróide.

3.2.2.3.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

As cepas de *Escherichia coli* típica não patogênicas isoladas dos pontos de aquisição anteriormente mencionados e todas *Escherichia coli* patogênicas sorogrupos EPEC-B: O125; EPEC-C: O86, O126, O128; EIEC-A: O29 e EHEC-O157 foram testados frente a antimicrobianos, cujo método utilizado foi o de Kirb-Bauer (Bauer *et al.*, 1976) com preparo de inóculo para leitura de cinco horas com uso de polidisco 24 Vitor Lorian. O meio base utilizado foi o Ágar Müeller Hinton (Merck nº 1.05437).

As cepas isoladas, biotipificadas e sorotipadas, em estoque, conforme 3.2.2.3.2 foram mantidas em meio ambiente durante 30 minutos, sendo após esse tempo semeadas em Ágar Caso (Merck nº 1.05458) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. A partir dos subcultivos crescidos foram selecionadas quatro a cinco colônias iguais e emulsionadas em 4 mL de água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão nº 1 da escala de McFarland: 1mL de cloreto de bário a 1% com 99mL de ácido

sulfúrico a 1% (0,36N) que corresponde a $3,8 \times 10^8$ microrganismos por mililitro. As placas contendo Ágar Müeller Hinton, após serem retiradas da geladeira, incubadas à 37°C durante uma hora antes da semeadura e mantidas em temperatura ambiente por três a cinco horas, foram semeadas utilizando-se "swab" esterilizado embebido no inóculo, sendo espalhado homogeneamente na superfície do meio. Após a absorção do inóculo por alguns minutos, eram colocados os polidiscos 24, da marca Vitor Lorian, utilizando-se pinça previamente flambada e resfriada; sendo em seguida as placas incubadas à 37°C durante cinco horas. A leitura dos resultados da sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada medindo-se o tamanho das zonas de inibição de crescimento bacteriano com um halômetro, sendo a cepa bacteriana classificada em sensível ou resistente em função do diâmetro da zona de sensibilidade padrão estabelecida para cada antimicrobiano (Figura 23).

3.2.2.3.9 Verificação da viabilidade, experimental, das cepas de *Escherichia coli* patogênicas isoladas, em lingüiça suína frescal tipo toscana

Composição da massa

A massa usada teve a seguinte formulação para a lingüiça suína frescal tipo toscana:

- matéria prima	
carne suína -----	82,45%
papada -----	14,60%
- condimentos	
sal -----	2,41%
açúcar -----	0,095%
alho -----	0,19%
pimenta do reino preta -----	0,24%
- aditivo	
vitamina C ou eritorbato -----	0,025%

No processamento de produção, a matéria prima foi moída em disco com 12mm de diâmetro, seguida de pesagem e misturada por uma hora. Procedeu-se ao embutimento em tripa natural isenta de contaminação, formando-se gomos de ± 15 cm, pesando de 30 - 40

gramas. Os gomos foram amarrados com barbante esterilizado para minimizar as variáveis contaminantes (Figura 24).

Antes da contaminação experimental do embutido com as cepas de *Escherichia coli* isoladas, sorotipadas e estocadas (EPEC - B O125, EPEC - C O86, EPEC - C O126, EPEC - C O128, EIEC - A 029, EHEC - O 157), o produto foi analisado com vista à eventual presença deste microrganismo, seguindo-se as metodologias descritas em 3.2.2.3.5 e 3.2.2.3.6. Durante a realização desta fase do experimento, o produto foi mantido congelado. Constatada a ausência do microrganismo em questão, o embutido foi descongelado tecnologicamente procedendo-se à sua contaminação com as estirpes isoladas e estocadas.

O preparo das suspensões bacterianas para inoculação no produto, foi assim sequenciado: as cepas estocadas conforme 3.2.2.3.2 foram semeadas em Ágar Caso inclinado incubado à 35°C por 18-24 horas que foram suspensas em SFT de Butterfield e o número de células bacterianas por mililitro, padronizado, através do "The International Reference of Opacity" de forma a obter-se a concentração de 10^{10} células por mililitro. As suspensões padrões foram diluídas sucessivamente em SFT de Butterfield, com o intuito de obter-se concentrações aproximadas de 10^2 a 10^3 bactérias por mililitro, complementadas com a técnica de contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, para demonstração do número de células viáveis nos inóculos. Estas diluições passaram a constituir as suspensões contaminantes para o produto.

Cada gomo foi inoculado, separadamente, com cada uma das cepas, perfazendo um total de 24 gomos e seis cepas, com 3 mL de cada uma das suspensões (10^2 , 10^3) (respeitando-se a proporção de 500 gramas de massa para 50 mL de inóculo) utilizando-se seringas esterilizadas, cujas inoculações foram feitas nas extremidades e na parte mediana de cada gomo para distribuição mais uniforme. Em seguida os gomos inoculados, foram acondicionados separadamente em sacos de "stomacher" esterilizados ou sacos "plastistéril", lacrados e estocados em refrigeração, de 4°C, controlada rigorosamente com termómetro de máxima e mínima, observando o mesmo nível encontrado no comércio varejista por um, dois, quatro e sete dias (Figura 25).

Paralelamente, às amostras de embutidos (lingüiça toscana) inoculadas com os cultivos, foram mantidas, nas mesmas condições, unidades dos embutidos sem prévia inoculação (controle negativo) para observar-se as alterações de cor e odor em função do

prazo de vida comercial, sendo as amostras analisadas quanto a estes aspectos no 1º, 2º, 4º e 7º dias de manutenção a 4°C, comparando-as com as amostras inoculadas (Figura 26).

Em cada um dos intervalos do armazenamento, procedeu-se a análise bacteriológica dos gomos inoculados, com as duas diluições, na tentativa de reisolar-se e identificar-se as cepas de *Escherichia coli* inoculadas, conforme descrito previamente em 3.2.2.3.5 e 3.2.2.3.6.

3.2.2.3.10 Análise estatística dos resultados

A análise estatística descrita foi determinada pela média e variações entre as médias usando intervalo de confiança de 95% (5% de erro), pela análise de variância e Teste de Tukey Kramer.

4 RESULTADOS

As Tabelas e Figuras utilizadas na demonstração dos resultados da pesquisa encontram-se nos apêndices, item 8 (páginas 135-150). Os resultados estão agrupados em conformidade com os procedimentos analíticos efetuados e os tipos de amostras analisadas.

4.1 ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES, COLIFORMES FECAIS E *Escherichia coli* – MÉTODOS 1 e 2

4.1.1 Região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria

A Tabela 1 fornece o NMP por amostra analisada, sendo que para o método 1 a variação de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* foi respectivamente < 2 a 46, < 2 a 33 e de ausência a 33 por grama, sendo que cinco (25%) amostras, quatro (20%) amostras e quatro (20%) amostras estavam contaminadas por coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, respectivamente. Para fins estatísticos o NMP < 2 foi considerado como zero, pelo fato de tal resultado oferecer a combinação de 0 – 0 – 0 na primeira, segunda e terceira séries, respectivamente, significando ausência de crescimento. O NMP de coliformes fecais foi o mesmo de *Escherichia coli*, pois todos coliformes fecais foram identificados como *Escherichia coli*.

Na Tabela anteriormente citada o NMP para o método 2 teve variação, respectiva, de coliformes totais e *Escherichia coli* de zero (ausência) a 28 e de zero (ausência) a 18, nas amostras. Cinco (25%) amostras estavam contaminadas por coliformes totais e *Escherichia coli*.

4.1.2 Cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais)

Na Tabela 1 são encontrados os valores para NMP, onde pelo método 1 apenas uma (5%) amostra apresentou-se contaminada por coliformes, as demais estavam isentas deste grupo, por apresentarem combinação múltipla de tubos de fermentação (0 – 0 – 0) que estabelece numericamente $NMP = < 2$ coliformes por grama de amostra, que foi considerado como zero para fins estatísticos. Em nenhuma das amostras foram encontrados coliformes fecais ou *Escherichia coli*.

Para o método 2, na Tabela 1, duas (10%) amostras apresentaram-se contaminadas por coliformes totais (dois coliformes por amostra) e em nenhuma amostra foi detectada a presença de coliformes fecais ou *Escherichia coli*.

4.1.3 Cavidade pélvica (Região sub-sacral próxima à base da cauda)

Na Tabela 1 são retratados os valores para NMP, onde pelo método 1 os coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, variaram respectivamente de < 2 a 1600, de < 2 a 1600 e de ausência a 1600, cujo percentual de contaminação ocorreu em 14 (70%) amostras para os respectivos microrganismos.

Para fins estatísticos os valores < 2 foram considerados como zero conforme justificativas já mencionadas.

O NMP dos coliformes fecais foi o mesmo de *Escherichia coli* e todos os coliformes fecais foram identificados como *Escherichia coli*.

Considerando-se o método 2, são encontrados na Tabela 1, o NMP para coliformes totais e *Escherichia coli*, variando de zero a 276, e de zero a 195, respectivamente; sendo que em treze (65%) amostras foram encontrados os microrganismos em questão.

4.2 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC) E *Escherichia coli* O157:H7 – MÉTODO 3

A Tabela 3 fornece o número de colônias de *Escherichia coli* confirmadas nas diferentes amostras pelo método 3, deixando claro que dentre os tipos de amostras que são usadas para consumo, àquelas oriundas da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) apresentaram maior número de colônias confirmadas, porém, nenhuma

delas pertence às categorias EPEC ou EHEC, entretanto, as amostras de linfonodos mesentéricos e fezes apresentaram, respectivamente, 36 e 48 colônias confirmadas através das provas bioquímicas com uma cepa EPEC e uma cepa EHEC, respectivamente.

4.3 PESQUISA DE COLÔNIAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA (Mehlman & Lovet, 1984c) MODIFICADO – MÉTODO 4

Encontra-se nas Tabelas 4 e 8 o número de colônias de *Escherichia coli* confirmadas por tipo de amostra no método acima mencionado, onde o número de colônias isoladas por enriquecimento sempre foi superior ao número de colônias isoladas por plaqueamento direto.

Os resultados com referência à triagem de colônias H₂S positivas, sorogrupos patogênicos e eficiência entre os meios empregados, encontram-se alocados nas tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 descritas seqüencialmente.

Na Tabela 5 é encontrado o número de colônias de *Escherichia coli* suspeitas, triadas pela presença de H₂S e confirmadas em testes bioquímicos e são mencionados os números de sorogrupos identificados e as respectivas amostras consideradas positivas para os mesmos, sendo a maior ocorrência em amostras de fezes.

Considerando-se os dados desta Tabela, observa-se que das 2298 colônias suspeitas, 937 (40,77%) foram dispensadas por serem H₂S (+) e 1361 (59,23%) confirmadas nos testes bioquímicos, destas 17 (1,25%) foram consideradas positivas para sorogrupos EPEC, EIEC e EHEC.

No total de 100 amostras analisadas, duas amostras da ferida de sangria estavam contaminadas por EPEC (C O86). Nenhuma amostra isolada da cavidade torácica apresentou sorologia positiva para os sorogrupos estudados. Duas amostras da cavidade pélvica estavam contaminadas por EIEC (A O29). Seis amostras de linfonodos mesentéricos estavam contaminados por EPEC (duas cepas B O125, uma cepa C O86, duas cepas C O126, uma cepa C O128) e sete amostras de fezes estavam contaminadas por *Escherichia coli*, sendo quatro EPEC (uma cepa B O125, uma C O86, duas cepas C O128), EIEC (duas cepas A O29) e EHEC (uma cepa O 157). Logo, nas amostras mencionadas observa-se que três (3%), quatro (4%), dois (2%), três (3%), quatro (4%) e um (1%) estavam contaminadas, respectivamente, pelos sorogrupos B O125, C O86, C O126, C O128 de EPEC; O29 de EIEC e O157 de EHEC). Nesta mesma Tabela é encontrado o

número de amostras positivas para *Escherichia coli* e sorogrupos identificados para cada tipo de amostra analisada.

Na Tabela 6 estão relacionados os meios de cultura e os correspondentes sorogrupos encontrados, constando que o meio Ágar *Escherichia coli* O157:H7 e Meio MacConkey sorbitol apresentaram número maior e igual de sorogrupos identificados entre os meios de plaqueamento testados.

Pela análise de variância os dados não apresentaram diferença significativa entre si.

Na Tabela 7 é encontrado o número de colônias suspeitas e confirmadas pelos métodos um, três e quatro onde no método 4 sempre houve maior número de colônias suspeitas e confirmadas pela semeadura, após enriquecimento, do que pela semeadura direta. Entre os métodos acima mencionados aquele em que se obteve o maior número de colônias suspeitas e confirmadas foi método 4b, por semeadura após o enriquecimento, sendo que das 1584 colônias suspeitas, 59,47% (942/1584) foram confirmadas.

Pela análise estatística houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de métodos utilizados no isolamento e identificação de *Escherichia coli*. Tais diferenças entre os métodos pelo teste de Tukey-Kramer, ocorreram entre Met1cT X Met4B, Met1cF X Met4B, Met3 X Met4B. Considerando-se que entre os métodos testados, o método 4 foi o que apresentou o maior número de colônias confirmadas.

Na Tabela 8 é encontrado o número de colônias isoladas em cada um dos meios de plaqueamento seletivo quer seja por plaqueamento direto quer por enriquecimento em cada tipo de amostra pesquisada. Pela análise de variância houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a semeadura direta e enriquecimento independentemente do tipo de meio de plaqueamento usado. Não ocorreu diferença estatística significativa entre os tipos de meios usados nas semeaduras entre os diferentes tipos de amostras analisadas. Isto possivelmente, foi prejudicado pela grande quantidade de zeros (resultados negativos).

Pela análise de variância houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os meios usados, pelo método de enriquecimento, entre os diferentes tipos de amostras analisadas. Pelo método de Tukey-Kramer houve diferença ($P < 0,05$) entre: EMB e TC-SMAC, MAC-LAC e TC-SMAC, MAC SORB e TC-SMAC, TC-SMAC e O157:H7.

Encontra-se na Tabela 9 a quantificação dos isolamentos de *Escherichia coli* enteroinvasora e enterohemorrágica nas diferentes amostras analisadas.

Todas as cepas isoladas e identificadas, pelos métodos convencionais, supra citados, foram bioquimicamente confirmados no sistema API – 20E.

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas foram resistentes a carbenicilina, ceftazidina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina e rifampicina, cujo resultado completo do teste do antibiograma pode ser visualizado na Tabela 10, onde se observa que as 17 cepas foram 100% sensíveis apenas a dois antibióticos e 100% resistentes a sete, enquanto que para as 15 cepas restantes a resposta foi variável. Todas as cepas isoladas apresentaram-se resistentes a pelo menos sete antibióticos e sensíveis apenas a dois antibióticos.

A Tabela 11 apresenta a sensibilidade e resistência de cepas de *Escherichia coli* (tipo 1) não patogênicas isoladas dos diferentes tipos de amostras analisadas, onde observaram-se que as oriundas da cavidade torácica apresentaram maior resistência aos antibióticos testados.

4.5 SOROLOGIA E TESTE DE “POLYMERASE CHAIN REACTION” (PCR)

Nas tabelas 3,5,7 e 9 são encontrados os sorogrupos isolados, sua quantificação, número de colônias oriundas e suas respectivas amostras.

Utilizou-se PCR em apenas um isolamento identificado sorologicamente como EHEC – O157, pois apesar do mesmo apresentar-se como sorbitol positivo e MUG positivo, comportou-se negativamente frente aos sorogrupos pertencentes às categorias (EPEC A, EPEC B, EPEC C, EIEC A e EIEC B), entretanto, aglutinou frente ao soro anti EHEC – O157 em tempo inferior a 60 segundos paralelamente à cepa padrão, sendo a prova repetida e confirmada. A sorologia positiva foi também confirmada em testagem no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo em seguida corroborada com a identificação de cepa O157:H⁻ por PCR nesta mesma Universidade. Esta cepa também foi caracterizada H⁻ por apresentar-se imóvel nos meios SIM e MILI usados na metodologia analítica.

4.6 VIABILIDADE EXPERIMENTAL

Nos experimentos realizados na segunda fase, os sorogrupos inoculados foram recuperados em todas as concentrações nos diferentes períodos de armazenamento e nas condições de frigorificação.

Quando aplicada à metodologia citada em 3.2.2.3.5 todos os sorogrupos testados foram recuperados e apresentaram no plaqueamento colônias esverdeadas, embora MUG positivas, comportamento bioquímico e sorológico idêntico ao primo isolamento.

Ao aplicar-se a metodologia descrita em 3.2.2.3.6, nas sementeira direta, todos os sorogrupos foram recuperados, só não ocorrendo crescimento no meio ágar TC-SMAC. Nos demais meios as colônias foram características, entretanto no ágar *Escherichia coli* O157:H7 fluorocult, apesar de MUG positivas as colônias, apresentaram-se esverdeadas. O comportamento bioquímico e sorológico apresentado foram os mesmos do primo isolamento, não ocorrendo modificação fenotípica do microrganismo pela ação das substâncias químicas, adicionadas no preparo dos embutidos, como também pela ação na estocagem do produto. Nesta mesma metodologia, utilizando-se o enriquecimento para isolar EPEC, a recuperação, o comportamento e os resultados encontrados foram os mesmos da sementeira direta. Tanto as amostras de embutidos inoculados com os cultivos de *Escherichia coli*, quanto às mantidas como controle negativo, apresentaram cor e odor “sui generis” no 1º, 2º e 4º dias de manutenção a 4°C, entretanto no 7º dia quer sejam as amostras inoculadas, quanto as isentas da microbiota de inoculação, apresentaram coloração esverdeada na superfície interna e odor característico de alteração incipiente, indicando que até o 4º dia as amostras de lingüiça frescal tipo toscana, quando mantidas nestas condições, apresentaram características visuais e olfativas (sensoriais) próprias para o consumo, corroborando com o que ocorre em nível de comercialização nas redes dos grandes supermercados, que estabelecem o prazo de vida comercial de quatro dias quando este alimento é mantido nas condições mencionadas.

5 DISCUSSÃO

Na atualidade as características da *Escherichia coli* como indicadora de contaminação fecal e condições higiênicas insatisfatórias, a atuação patogênica das diferentes cepas descritas, a possibilidade de transmissão de resistência antimicrobiana para outros microrganismos e para as diferentes classes de ingestores de alimentos; têm sua presença como um desafio na indústria alimentícia e na cadeia alimentar quando são levadas em consideração as boas normas de fabricação e aplicação da APPCC, pois é de preocupação nacional e internacional, os perigos voltados à saúde do consumidor e impactos ambientais que as categorias de *Escherichia coli* patogênicas ou não possam determinar.

A enumeração de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* avaliada pelos métodos 1 e 2 em amostras da região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria quando analisada estatisticamente, não apresentou diferença, nesta análise, nas amostras pesquisadas, sendo isto esperado em função dos valores encontrados e o pequeno número de observações procedidas, para que a pesquisa se tornasse viável, e a baixa contaminação das amostras que geraram valores zero, tanto no método 1 como para o método 2.

Na análise estatística pela análise de variância, das amostras da cavidade torácica entre a 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais), analisadas pelos métodos 1 e 2, não foi observada diferença entre o NMP de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*. Tal comportamento era esperado devido aos baixos valores encontrados, sugerindo baixas contaminações, e pequeno número de amostras analisadas nos métodos, cujo comportamento foi necessário para tornar exequível a pesquisa.

Analisando-se estatisticamente, pela análise de variância, o NMP das amostras da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) encontrado na experimentação pelos métodos 1 e 2, não foi possível detectar diferença entre o NMP das amostras citadas, cujo comportamento era esperado em função da pequena microbiota presente nas amostras, originando valores zero, associada ao número pequeno de amostras, para atender aos objetivos das pesquisa, viabilizando o estudo.

Os valores dos NMP encontrados na Tabela 1, permitem observar alguma diferença entre os NMP dos métodos aplicados e os respectivos microrganismos estudados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) pela análise de variância. Significando que não houve diferença de crescimento entre os microrganismos pelos diferentes métodos de cultivo empregados. Não houve diferença entre os tratamentos para coliformes e *Escherichia coli* pelos métodos 1 e 2 (Tabela 2), mesmo homogeneizando-se os valores encontrados através de logaritmos, quando as médias foram comparadas pela análise de variância.

No isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7 – método 3, os valores encontrados, não revelaram diferença significativa entre o total de colônias por tipos e entre os tipos de amostras, pela análise de variância, quando estudados estaticamente os valores da Tabela 3.

A pesquisa de colônias de *Escherichia coli* enteropatogênica (Mehlman & Lovett, 1984c) modificado – método 4, cujos valores encontrados na Tabela 4, ao serem analisados estatisticamente, os meios de plaqueamento por semeadura direta não apresentaram diferenças estatísticas entre as médias pela análise de variância, todavia, ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre os meios quando a semeadura foi procedida após o enriquecimento, ao ser estudado pelo método de Tukey-Kramer.

Na análise de variância dos dados da Tabela 5, não foi observada diferença entre a quantidade de colônias por tipo de amostra e *Escherichia coli* patogênicas sorotipadas.

Considerando-se as cepas patogênicas, das 100 amostras de origem suína analisadas foram identificadas 1361 colônias de *Escherichia coli* com 17 (1,25%) cepas positivas para os grupos EPEC, EIEC, EHEC. O total de amostras positivas para EPEC foi de 12 (12%) ao considerar-se todos os tipos de amostras analisadas. Com referência à identificação dos sorogrupos da categoria EPEC a maior ocorrência foi em linfonodos (6), seguida de fezes (4) e ferida de sangria (2). Quanto à presença de sorogrupo da categoria EIEC ocorreram duas na cavidade pélvica e em fezes, e uma EHEC O157:H também em

fezes, conforme, Tabela 5. Nenhuma categoria de EPEC, EIEC ou EHEC foi isolada de amostras da cavidade torácica. A ocorrência das categorias de *Escherichia coli* anteriormente mencionadas, foi relativamente baixa, sendo este resultado similar aos encontrados por outros pesquisadores no Brasil ao estudarem *Escherichia coli* em produtos cárneos. Reis *et al.* (1980) encontraram *Escherichia coli* patogênica em 5%, 7,5% e 10% de amostras de quibe, hambúrguer e salsicha, respectivamente. Tamminga *et al.* (1982), embora em condições ecológicas e climáticas regionais diferentes do trabalho ora apresentado, também relatam que somente parte de *Escherichia coli* encontrada em carne moída foi patogênica. Petri *et al.* (1989a) detectaram 924 isolamentos de *Escherichia coli* provenientes de 193 amostras de carne moída e quibe cru, encontrando 16 (1,7%) isolamentos de EPEC provenientes de 16 (8,3%) amostras de alimentos. Franco *et al.* (1991) encontraram baixíssima frequência do sorogrupo O15 em carne crua bovina das 306 colônias testadas. Cerqueira (1993) ao identificar 1.066 colônias de *Escherichia coli* em amostras de carne moída, quibe e almôndega encontrou 7,3% de *Escherichia coli* enteropatogênica em relação ao número de isolamentos e 34,3% em relação ao número de alimentos analisados. Todavia Cerqueira *et al.* (1997) classificou como baixo índice o isolamento de EPEC em carne moída.

Nesta pesquisa, nas amostras comestíveis analisadas pelos métodos 1 e 2, que foram positivas, o NMP de coliformes totais foi na maioria das vezes superior ao de *Escherichia coli* concordando com pesquisa desenvolvida por Laubach *et al.* (1998) em carne de cabeça de suíno.

No presente trabalho, para as amostras da região interna da papada correspondentes à área de ferida de sangria, com os achados constantes na Tabela 1, estabelecem que houve correspondência entre ausência e presença de coliformes e *Escherichia coli*, entre as amostras, pelos métodos empregados, entretanto, em 95% dos casos, no método 1, o NMP de coliformes e *Escherichia coli* foi superior ao do método 2, embora o método 2 não caracterizasse a presença de coliformes fecais. A Resolução RDC nº 12 (Brasil, 2001) não estabelece padrões qualitativos ou quantitativos para quaisquer tipos de coliformes entre as amostras comestíveis investigadas, entretanto, esta Resolução estabelece que “a denominação de coliformes à 45°C é equivalente à denominação de coliformes de origem fecal e de coliformes termotolerantes. Recomendando que, caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico. Os conceitos internacionais reconhecidos citam que a denominação coliformes à 35°C seja equivalente à denominação

do grupo coliforme, e de coliformes totais e, para coliformes fecais àqueles que crescerem entre $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, tendo como principal representante a *Escherichia coli*. A “International Commission on Microbiological Specification for Foods” “ICMSF” através de procedimentos e instruções gerais estabelece que as características do produto (a_w , pH, nutrientes e outros fatores internos); origem e procedência (ecologia e distribuição dos microrganismos nas matéria primas e no ambiente); efeito do processamento sobre a microbiota do produto comercializado/exposto ao consumo e suas possíveis falhas; distribuição, conservação, armazenamento, condições de exposição à venda e possíveis abusos de tempo/temperatura e outras e, finalmente, as condições de uso e preparo no produto pelo consumidor e suas possíveis falhas, são fundamentais para estabelecer as metodologias para amostragem, obtenção, acondicionamento, transporte e análises microbiológicas. Para as amostras comestíveis analisadas neste trabalho, espera-se que ocorra redução de microrganismos, isto é, que o alimento sofra cocção imediatamente antes do consumo, o que eliminará o perigo de doenças transmissíveis por alimentos (DTA).

Geralmente, as carnes oriundas da ferida de sangria são usadas para a produção de embutidos, entretanto, em muitos casos são usadas para consumo humano “in natura”, que sugere o procedimento analítico destas amostras.

Apesar da indicação dos pontos de obtenção utilizados nesta pesquisa, serem usados internacionalmente, não foram encontrados trabalhos retratando a pesquisa e/ou enumeração de coliformes, coliformes fecais e/ou *Escherichia coli* em área de ferida de sangria em suínos pela obtenção de fragmentos de carne. Gill *et al.* (1995), ao analisarem amostras da área de ferida de sangria em bovinos, obtendo-as com “swab” e esponja, encontraram em torno de 25 *Escherichia coli* por 100 cm^2 considerando-as moderadamente contaminadas, ao utilizarem meio contendo MUG. No método 2 aqui aplicado, onde há inclusão de MUG no meio base, apenas uma (5%) amostra apresentou 18 *Escherichia coli*, quatro (20%) apresentaram valores entre 16 e uma *Escherichia coli* e 15 (75%) ausência de isolamentos de *Escherichia coli*, caracterizando baixa contaminação das amostras.

Os métodos 3 e 4 de enriquecimento das amostras a serem pesquisadas quanto a presença de *Escherichia coli* foram comparados entre si. No método 3 ocorreu maior recuperação e confirmação de isolados de *Escherichia coli* que no método 4 por semeadura direta; porém, no método 4, com enriquecimento, independentemente do meio usado e temperatura de incubação, o número de isolados suspeitos e confirmados foi

sempre foi maior (Tabela 7). Nestes procedimentos analíticos o método 4 apresentou maior número de colônias confirmadas em relação ao número de isolados triados, e o meio com maior percentual de recuperação foi MAC LAC (54,2%) seguido por EMB (31,11%), MAC SOR (29,6%), ÁGAR O157:H7 (23%), HC 44,5°C (23%), TC – SMAC (16,7%) e HC 35°C (13%) confirmando, como indica a técnica original, que o uso do MAC LAC apresentou bons resultados para determinação de *Escherichia coli* em alimento, tal como ocorreu com as amostras em epígrafe, inclusas na Tabela 4.

O ideal para o consumidor e para a indústria alimentícia é que os produtos de origem animal tenham tolerância zero de carga microbiana para salubridade global. Entretanto, alguns fatores podem ser impeditores de tal proposta. Ao analisarmos os resultados referentes às amostras originárias da região da cavidade torácica entre a 4ª e 7ª costelas (pleura e músculo intercostais), constantes da Tabela 1, levando-se em consideração os organismos em estudo, tal assertiva está bem próxima desta realidade, pois fatores intrínsecos e extrínsecos não foram capazes de aumentar a carga colimétrica nas amostras, e através de observação descritiva dos resultados, desta pesquisa, evidencia-se que no método 1 nenhuma das amostras apresentou coliformes, coliformes fecais ou *Escherichia coli*, porém, quando analisadas pelo método 2, apenas duas (10%) amostras apresentaram dois coliformes totais e ausência de *Escherichia coli*, e as demais completamente ausentes destes germes.

Na aplicação dos métodos 3 e 4, o enriquecimento não seletivo das amostras tem como objetivo revitalizar as células injuriadas objetivando melhor eficácia na determinação da microbiota em questão. Observando-se a Tabela 7 esta afirmação torna-se fundamentada pois no método 3 e no método 4 com enriquecimento, ao ser comparado o número de colônias suspeitas e confirmadas nos meios de plaqueamento seletivo com o meio de plaqueamento no método 1 e na detecção pelo método 2 (Tabela 1), os números de colônias naqueles métodos são bem mais superiores que nestes. O método 4 por semeadura direta (Tabela 7) apresentou crescimento menor. Tais observações deixam claro que o enriquecimento teve importância na estimativa de um maior número de colônia suspeita e confirmada nos testes bioquímicos.

Na ciência e tecnologia de carnes, determinados cortes ou peças são considerados nobres não só pela sua importância econômica como também por suas características sensoriais, entretanto, nem sempre existe interrelação entre tais aspectos e a qualidade microbiológica destes alimentos. Nesta pesquisa corrobora-se esta afirmativa ao

compararem-se os resultados encontrados nas análises para as amostras da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) Tabelas 1, 3 e 4, com os encontrados para os da cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais) Tabelas 1, 3 e 4, pois aquelas amostras apesar de serem economicamente, sensorialmente e tecnologicamente mais valiosas, se apresentaram muito mais contaminadas por todos os métodos desenvolvidos. Considera-se tal discussão apropriada pois os diferentes tipos de amostras sempre partiram de um mesmo animal, concomitantemente.

As amostras da cavidade pélvica, analiticamente, pelo método 1, seis (30%) delas não continham coliformes, coliformes fecais ou *Escherichia coli*, porém 14 (70%) apresentaram estes organismos. Entretanto, pelo método 2, sete (35%) delas não apresentaram a microbiota em questão e 13 (65%) possuíam tais microrganismos.

Confrontando-se os resultados obtidos nos métodos 1 e 2 através da Tabela 1, fica claro que houve proporcionalidade de ausência e presença dos organismos pesquisados, entre as amostras da cavidade pélvica, porém com variação numérica. Entre os métodos aplicados, observa-se através da Tabela 7 que o enriquecimento não seletivo também foi fundamental na recuperação e confirmação de colônias típicas de *Escherichia coli* como já discutido anteriormente. Os meios MAC LAC e HC a 35°C foram os mais apropriados por apresentarem maior número de colônias suspeitas e confirmadas bioquimicamente.

Comparando-se os tipos de amostras comestíveis pesquisadas entre si (Tabelas 1, 3, 4 e 5) observa-se que independente do método aplicado, as amostras da cavidade pélvica apresentaram maiores valores bacteriológicos. As pesquisas nacionais não revelam estudo colimétrico em carnes de suíno na área anatômica em questão, contudo quando Gill *et al.* (1995) procederam estudo semelhante em carcaça bovina, embora com método de coleta diferenciado e meio similar, também sugeriram, como nossos achados, que esta área seja a mais contaminada entre as outras pesquisadas. Gill & Jones (1998) ao enumerarem *Escherichia coli* em carcaça suína pelo método de swab na região anatômica correlata com esta pesquisa sugeriram, também, contaminação elevada. Korsak *et al.* (1998) ao desenvolverem técnica de amostragem em pontos similares a esta pesquisa para detecção de patógenos em carcaças suínas, tendo como meta a eficácia do plano HACCP, detectaram *Escherichia coli* em 14% das amostras.

Fisiologicamente, microbiologicamente e anatomopatologicamente é de amplo conhecimento que os linfonodos podem conter microbiota muito intensa e diversificada, pois os vasos aferentes e eferentes podem não só contribuir com a introdução de

microrganismos neste órgão como dispersão destes para outros tecidos, órgãos e sistemas. Nesta pesquisa conforme consta na Tabela 5, a suspeita e confirmação de *Escherichia coli* em linfonodos mesentéricos foram maiores, no total geral, considerando-se os métodos 3 e 4 aplicados aos demais tipos de amostras cárneas analisadas, sugerindo que a proposição anteriormente mencionada tem validade, para as bactérias estudadas e mostrando que este órgão pode ser um veiculador de microbiota para os diferentes nichos ecológicos, quando do rompimento de sua cápsula durante as fases de processamento tecnológico de abate.

Grande parte da microbiota intestinal dos animais de açougue, principalmente suínos em idade de abate, é constituída por *Escherichia coli*. Contudo, a sua onipresença em fezes pode não só contaminar diretamente as carcaças, como indiretamente através de equipamentos, utensílios e manipuladores, o que não deixa de ser um grande risco epidemiológico à saúde pública, através da ingestão de alimentos contaminados e dependendo da categoria de *Escherichia coli* e seus sorogrupos e/ou sorotipos, podem colocar em risco o meio ambiente com impactos severos para o bem comum. Com vista a estes aspectos, pesquisou-se *Escherichia coli* em fezes da região íleo-ceco-cólica e os métodos 3 e 4 desenvolvidos mostraram a presença de *Escherichia coli*. No método 3 detectou-se EHEC O157:H, enquanto que no método 4, por semeadura direta, o meio HC a 35°C e à 45°C, indicou a presença de EPEC C O128 e EIEC A O29, respectivamente; porém, no método 4, por enriquecimento, foram detectadas EIEC A O29 e EPEC C O86, EPEC B O125 e EPEC C O128 nos meios MAC LAC, O157:H7, respectivamente, conforme Tabela 6 e 7. Ao comparar-se a presença dos sorogrupos em amostras de linfonodos mesentéricos (região íleo-ceco-cólica) e de fezes desta região, observa-se que houve equivalência entre EPEC C O128, EPEC C O86, e EPEC B O125, havendo apenas correspondência entre o meio de plaqueamento para EPEC B O125, que foi isolada no meio O157:H7, dados elucidados nas Tabelas 5 e 6.

Os alimentos de origem animal podem desempenhar um importante papel na veiculação de coliformes, coliformes fecais ou *Escherichia coli* e seus sorogrupos ao Homem. Tem sido relatada a presença destes microrganismos em produtos cárneos inclusive naqueles em que *Escherichia coli* patogênica é implicada em surtos de toxinfecção alimentar (Riley *et al.*, 1983_a; Doyle & Schoeni, 1987; Doyle & Padyhe, 1989; Salmon *et al.*, 1989), porém tais microrganismos podem ser de ocorrência diversificada. Assim, Sack *et al.* (1977), isolaram 19 cepas enterotoxigênicas de alimentos de origem animal. Taminga *et al.* (1982) encontraram baixos índices de *Escherichia coli* patogênica em carne moída,

enquanto Doyle & Schoeni (1987) encontraram resultados variáveis em cortes de carne suína e cordeiro. Riley (1987) determinou a presença de EHEC em carne moída para hambúrgueres. Porém, Doyle & Padyhe (1989) caracterizaram a presença de EPEC em carne de porco resfriada e pastéis de carne em índices variáveis. Laubach *et al.* (1998) afirmaram que o número de coliformes foi superior ao número de *Escherichia coli* isoladas em carne de cabeça de suínos. No Brasil, Reis *et al.* (1980), Petri *et al.* (1989a,b), Jakabi & Franco (1991), Franco *et al.* (1991), Cerqueira *et al.* (1997) detectaram EPEC e ETEC em alimentos de origem animal, corroborando com os achados de *Escherichia coli* nas amostras alimentares desta pesquisa.

No Brasil, foram realizadas inúmeras pesquisas entre 1983 a 1999 em diferentes alimentos de origem animal com as mesmas técnicas aqui aplicadas, foram a saber: Franco (1983); Carvalho *et al.* (1985a); Carvalho *et al.* (1985b); Cerqueira & Franco (1986); Petri *et al.* (1989^a); Petri *et al.* (1989b); Calderon & Furlaneto (1990); Martins *et al.* (1993); Fuzihara & Franco (1993); Oliveira *et al.* (1996); Franco & Chaves (1997); Rall *et al.* (1997); Martins *et al.* (1997); Viestel *et al.* (1997); Campos & Serafini (1997); Florentino *et al.* (1997); Bersot *et al.* (1998); Sabioni *et al.* (1999); Pinto *et al.* (1999); Xavier *et al.* (1999); Oliveira *et al.* (1999); que encontraram NMP variáveis para coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* e seus sorotipos, onde sempre o NMP de coliformes foram superiores ao NMP de coliformes fecais e estes em alguns casos superiores ou iguais ao de *Escherichia coli*, porém nunca menores, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa para amostras comestíveis. Todavia, considerando-se que estes alimentos devem sofrer cocção antes do seu consumo e a Resolução RDC nº 12 de 02.01.2001 (Brasil, 2001) não estabelece padrão bacteriológico destes microrganismos deve ser vista com precaução, pois em determinadas amostras a recuperação e identificação de *Escherichia coli* patogênica pode ser um indicativo de perigo ao consumidor, principalmente para imunodeprimidos, idosos e usuários de antiácido.

O comportamento fenotípico com adição das provas bioquímicas é fundamental para a identificação bacteriana, porém, as literaturas reconhecidas, internacionalmente, referentes à determinação e sistemática bacteriana, indicam que as provas bioquímicas consideradas como positivas para os microrganismos podem apresentar 90-100% de positividade, enquanto que para o comportamento negativo pode ocorrer variação de 0 – 10%. Considerando-se que a *Escherichia coli* é negativa para a produção de sulfeto de hidrogênio e sendo esta variação normal, nem sempre as características morfológicas das

colônias em meios seletivos indicadores podem garantir que se isole somente colônias de *Escherichia coli* com este perfil, predominantemente, nas provas bioquímicas, apesar da maioria ou todas as características classicamente usadas para diferenciação da espécie *Escherichia coli* serem determinadas cromossomalmente, várias peculiaridades que não características de *Escherichia coli* têm sido encontradas em cepas típicas deste organismo. Lautrop *et al.* (1971) e Layne *et al.* (1971) descreveram cepas H₂S positivas de *Escherichia coli* sendo esta característica determinada por plasmídio. Ainda não se conhecem quais influências seletivas determinam o isolamento simultâneo de cepas de *Escherichia coli* H₂S positivas em diferentes partes do mundo. Nesta pesquisa utilizou-se o meio SIM conforme descrito em 3.2.2.3.2 para selecionar e separar cepas H₂S negativas das cepas H₂S positivas, em cada um dos métodos e meios de plaqueamento seletivo utilizados, que foram estocadas para futuras investigações. As citações de Lautrop *et al.* (1971) e Layne *et al.* (1971) foram aqui confirmadas, entretanto não foram corroboradas por Scaletsky *et al.* (1982a,b) onde nenhuma das cepas identificadas eram produtoras de H₂S e Toledo *et al.* (1982a,b) ao desenvolverem meio de cultura para a triagem de enterobactérias caracterizam que as cepas de *Escherichia coli* não são produtoras de H₂S. O desenvolvimento de novas pesquisas são justificadas para elucidar este aspecto, tendendo aperfeiçoar as técnicas de isolamento e identificação bacteriana, pois a partir de meios de plaqueamento seletivo, com base nestas citações, muitos diagnósticos falso positivos podem estar ocorrendo, pelo fato da bactéria em questão corresponder às características morfocoloniais no meio de plaqueamento, e na realidade ser um outro microrganismo lactose positiva que é o substrato de eleição para os coliformes, uma vez que os meios não são 100% seletivos. Por outro prisma, muitos diagnósticos falso negativos podem estar ocorrendo, pois em provas bioquímicas muitas cepas de *Escherichia coli* H₂S positivas podem estar sendo dispensadas.

A dinâmica científica e a obrigatoriedade do saber, tem levado as instituições e pesquisadores à procura de novos métodos científicos e adaptação destes às diferentes regiões em função das variáveis que possam influenciar nos diagnósticos bacteriológicos, para enumeração e identificação de *Escherichia coli* em produtos e origem animal. Nesta pesquisa foram usados quatro métodos, sendo todos empregados em amostras comestíveis e apenas os métodos 3 e 4 para as não comestíveis (linfonodos e fezes). O método número 1, para coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, foi aplicado originalmente, cuja discussão em particular torna-se desnecessária pois a sua aplicação e aceitação, é de

renome internacional e centenas de instituições e milhares de pesquisadores o tem aplicado em todos os tipos de alimentos de origem animal. As citações de 1983 a 1999, no Brasil, já foram discutidas.

O método 2 foi aqui aplicado na sua originalidade e quando usado por Townsend *et al.* (1998) em amostras de suínos e seus derivados, frente ao método de enumeração (NMP), em conformidade com o paralelismo aqui desenvolvido, indicou também, resultados eficazes. Este método que quantifica a população de coliformes e *Escherichia coli* em alimentos requer apenas 24 horas de incubação sem a necessidade de outra fase confirmativa, entretanto, os outros métodos, inclusive a enumeração pelo NMP e os demais aqui aplicados, requerem longos períodos de incubação. A indicação fenotípica e colorimétrica desta técnica é analogicamente descrita por Adams *et al.* (1990) e AOAC (1995).

O método 3 foi testado em conformidade ao autor original, embora apresentando boa recuperação de *Escherichia coli* em função do enriquecimento seletivo, na fase de plaqueamento ocorreu a presença de um grande número de colônias H₂S positivas que foram repicadas e estocadas para futura confirmação ou não de *Escherichia coli*. Apesar da utilização do MUG seja atualmente muito divulgada não foram encontrados trabalhos determinando a presença de *Escherichia coli* por fluorescência, em meios de plaqueamento, em amostras originárias de suínos. Na Tabela 4 é observado que o meio ágar *Escherichia coli* O157:H7 em cuja composição, possui o MUG, quando comparado com os meios tradicionalmente utilizados como ágar EMB, ágar MacConkey lactose, ágar MacConkey sorbitol, não ocorreu diferença estatística significativa. Estes resultados vão em desencontro com os descritos por Venkateswaran *et al.* (1996) onde afirmam que o MUG adicionado ao meio ágar bile vermelho violeta, tornou-o duas vezes mais eficaz que o ágar EMB para isolar *Escherichia coli* em produtos cárneos, muito embora o meio agar *Escherichia coli* O157:H7 não tenha a mesma composição básica que o ágar bile vermelho violeta.

Nesta experimentação o método 4 foi modificado na fase de plaqueamento pela inclusão de outros meios de plaqueamento seletivo, como descrito em 3.2.2.3.6, para observar o favorecimento ou não da suspeita e confirmação da variável, presença ou não de H₂S, por cepas que apresentassem características morfológicas próprias de *Escherichia coli*; o que foi confirmada em muitos casos, quer seja na semeadura direta ou em enriquecimento cujo maior número de colônias sempre foi detectado (Tabela 4),

independente do tipo de amostra pesquisada. Cerqueira (1993) utilizou metodologia semelhante pesquisando *Escherichia coli* enteropatogênica em alimentos de origem animal sem no entanto considerar isolados de *Escherichia coli* que poderiam ser produtoras de H₂S.

A realização do antibiograma para *Escherichia coli* tornou-se fundamental tendo em vista os fatores ecológicos, genéticos, ambientais etc, pelo fato de que os sorotipos mais isolados são resistentes à maioria dos antibióticos como afirmam Campos & Trabulsi (1999) e esta afirmação é fundamentada ao observar-se as Tabelas 10 e 11 desta pesquisa, onde as cepas de *Escherichia coli*, patogênicas ou não, apresentaram em sua maioria grande espectro de resistência aos antibióticos testados. As linhagens de *Escherichia coli* isoladas por Scaletsky *et al.* (1982) apresentaram sensibilidade aos mesmos antibióticos aqui estudados. Hill *et al.* (1985), também pesquisando em alimentos de origem suína, verificaram semelhança com os resultados das Tabelas 10 e 11 ao afirmarem que 70% das cepas isoladas foram resistentes a pelo menos um antibiótico estudado, conforme ainda adverte Franco *et al.*, 1985 ao pesquisarem alimentos de origem animal.

Os achados inclusos na Tabelas 10 e 11 também mostram identidade com os achados de Ferreira *et al.* (1986a,b) ao afirmarem que utilizando a mesma metodologia em produtos de origem animal, as cepas de *Escherichia coli* foram sensíveis à gentamicina e tobramicina. Ainda estes autores, em 1996, encontraram resultados divergentes para alguns antibióticos, entretanto, 100% das cepas foram resistentes à carbenicilina, seguidas de eritromicina (91%), penicilina (90,3%) e nesta pesquisa as cepas patogênicas de *Escherichia coli* foram 100% resistentes a estes antibacterianos e a susceptibilidade foram equivalentes para ciprofloxacina e norfloxacina. Meng *et al.* (1998) também ressaltaram a importância da variabilidade de resistência antibiótica de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos, em conformidade com Ferreira *et al.* (1986a,b; 1996); Radu *et al.* (1998) ainda reafirmam a não identidade de resistência ou sensibilidade das *Escherichia coli* testadas. Oliveira *et al.* (1999) concluíram que os cultivos de *Escherichia coli* isoladas de hambúrgueres foram 100% resistentes à carbenicilina, clindamicina, eritromicina e rifampicina e 100% sensíveis à gentamicina, corroborando os resultados da Tabela 10. Atenções devem ser dadas a citação de Campos & Trabulsi (1999) quanto à realização de antibiograma na indicação quimioterápica em infecções determinadas por EPEC.

O estudo sorológico de estirpes de *Escherichia coli* é considerado importante em inúmeras situações ecológicas, principalmente ao ressaltar a ecologia bacteriana

relacionada com a microbiologia ambiental e global, objetivando identificar os sorogrupos de maior ocorrência alimentar. Os métodos sorológicos foram propostos para simplificar e melhorar a precisão dos resultados de identificação de microrganismos, patogênicos ou não. Até então, os métodos utilizados para identificação dos microrganismos, durante décadas, foram baseados no comportamento bioquímico frente aos mais variados substratos, o que representa trabalho excessivo e custo elevado. Paralelamente à técnica imunológica (sorologia) usa-se a reação de polimerase em cadeia, um dos mais avançados métodos rápidos em microbiologia, que visa a multiplicação exponencial de um único fragmento de DNA em poucas horas pela ação da enzima DNA polimerase tendo um segmento de DNA de fita simples como molde e constituindo a fita complementar deste segmento, através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) complementares às extremidades 3’ e 5’ do fragmento de DNA a ser copiado, porém, as etapas de enriquecimento são indispensáveis ao método (Franco & Landgraf, 1996; Gomes *et al.* 1999).

Ao aplicar-se o método sorológico em paralelo com aplicação da PCR, muitas das vezes os resultados podem ser conflitantes, pois a reação cruzada ou divergente pode existir, tal proposição é colocada em discussão por Aleksic *et al.* (1992) que ao pesquisarem o esquema de biotipificação para *Escherichia coli* O157:H7 concluíram que dez (25,6%) das cepas de *Escherichia coli* produtoras de SLT foram sorbitol positivas e não reconhecidas em placas MacConkey sorbitol e relatam que as duas cepas sorotipadas com O157 foram sorbitol e glucuronidase positivas não foram produtoras de SLT. Estas afirmações apresentam paralelismo à amostra aqui isolada como EHEC-O157:H⁺, em resultados, pelo fato de que o sorogrupo apresentou, no meio de plaqueamento ágar *Escherichia coli* O157:H7 colônias esverdeadas não se caracterizando como sorbitol positivas, porém foram diagnosticadas como positivas, para este carboidrato, nas provas bioquímicas e comportaram-se com glucuronidase positivas, sem produzir SLT no estudo de PCR. Estes mesmos pesquisadores demonstram o comportamento bioquímico destas cepas frente às outras provas fisiológicas, aqui estudadas, cujo perfil apresentado foi o mesmo. Gunzer *et al.*, 1992, enfatizam que a doença pode ser determinada por cepas variantes fenotípicas de O157:H⁺ produtoras de Stx₂, sendo isoladas de pacientes como síndrome urêmica-hemolítica na Alemanha, enquanto que Aleksic *et al.*, 1992; Bitzan *et al.*, 1993, relatam que estas são prevalentes na Europa Central. Para Feng *et al.*, 1998,

estas cepas são geneticamente pertencentes ao grupo clonal O157:H7, embora fermentem sorbitol e são positivas para a glucuronidase, entretanto Hayes *et al.*, 1995, reportam que nos Estados Unidos, somente variantes de O157:H7 glucuronidase positivas têm sido isoladas. Goldwater & Bettelheim, 1995, relatam que cepas não móveis de *Escherichia coli* (O111:H e O157:H) são comuns na Austrália. Neste mesmo país, o CDC (1995) confirma a ocorrência de surtos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica resultantes do consumo de lingüiça. Paton *et al.*, 1996; Bettelheim, 2002 são categóricos em confirmarem o isolamento de cepas EHEC, sorotipos O111:H e O157:H de pacientes e de produtos alimentícios, corroborando com os resultados desta pesquisa. Aleksik *et al.* (1992), sugerem que a confirmação bioquímica de *Escherichia coli* seguida da prova de toxicidade como a determinação antigênica completa O e H ou a determinação bioquímica do biotipo faz-se necessária para diagnóstico definitivo. Duarte *et al.* (1997) demonstram que em estudo desenvolvido em produtos lácteos, 93 colônias de *Escherichia coli* isoladas, quando pesquisada a presença do sorogrupo O157, através da soroaglutinação em lâmina, três (3,2%) sorotipadas como O157, não produziram SLT. Os resultados destes autores foram similares aos da presente pesquisa com referência a EHEC – O157:H. O isolamento desta cepa em fezes suína deve ser considerada de importância epidemiológica e de saúde pública pois os dejetos dos abatedouros, geralmente, não são tratados podendo contaminar o meio ambiente, lençol freático, equipamentos, utensílios, instalações, proporcionando a disseminação deste organismo até em regiões longínquas quando do transporte de suínos para abatedouros de outras localidades, principalmente, pela resistência de cepas de *Escherichia coli* às condições adversas e a sua potencialidade de agressão orgânica humana e animal.

Os resultados apresentados na viabilidade da microbiota patogênica, em lingüiça frescal tipo toscana, caracterizam que apesar dos embutidos utilizados como controle negativo, estivessem isentos de *Escherichia coli*, deveriam possuir outros microrganismos que possivelmente foram determinadores das alterações sob o ponto de vista visual e olfativo, entretanto, análises para tais verificações não foram procedidas tendo em vista a natureza deste trabalho.

Objetiva-se com os resultados encontrados nesta pesquisa oferecer subsídio para a atualização dos padrões de carne suína comercializada no Brasil, uma vez que a Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001) não estabelece como provas analíticas, análises quantitativas

ou qualitativas para este alimento com evidência aos coliformes fecais e/ou *Escherichia coli*.

A literatura tem demonstrado a importância da *Escherichia coli* como microrganismo indicador da inocuidade e qualidade microbiológica de alimentos e o significado das cepas enteropatogênicas como microrganismo infeccioso, revelando ainda que esta espécie bacteriana tem relevante significado nos PPHO e à implantação dos sistema de prevenção e controle com base na APPCC.

A presença de *Escherichia coli* em alimentos e *Escherichia coli* O157:H⁻, O157:H7, ressalta a necessidade de se colocar em prática o sistema nacional e internacional de inocuidade dos alimentos objetivando eliminar do abastecimento os alimentos para o consumo humano e os animais enfermos ou portadores assintomáticos, cuja carne possa transmitir enfermidades aos comensais. Em particular, concentram-se nos riscos associados com microrganismos patógenos que não causam, necessariamente, enfermidades visíveis nos animais portadores. As enfermidades transmitidas pelos alimentos podem causar desde um simples transtorno digestivo a problemas de saúde muito graves, potencialmente mortais como colite hemorrágica, síndromes hemolítica urêmica e púrpura trombocitopênica trombótica, associadas a *Escherichia coli* O157:H7. Entretanto, a grande percentagem das enfermidades transmitidas por alimentos são preveníveis, sendo obrigatório que os microbiologistas criem medidas para impedir sua ocorrência. Entretanto, é sabido que estão surgindo outros agentes patógenos novos e há necessidade do preparo técnico-científico para fazer frente à estes riscos incipientes. O “Food Safety and Inspection Service, Meat and Poultry Products” (2001), preocupado com a epidemiologia e os riscos referentes a ocorrência e disseminação dos microrganismos emergentes, determinou a criação de programas integrados de proteção de alimentos, fornecendo dados sobre a retirada, do mercado, de alimentos contaminados nos Estados Unidos, representando cifras importantes: vinte milhões de libras de carne moída retirada do mercado por suspeita de contaminação com *Escherichia coli*, principalmente, *Escherichia coli* O157:H7.

Extensivos estudos são desenvolvidos no Brasil, nos Estados Unidos da América e Inglaterra, mostram, conforme Bettelheim (2002) que em geral a *Escherichia coli* presente em carnes é proveniente de fezes e conteúdo instestinal de animais, e ao sobreviver ao abate e ao processamento tecnológico, seja a provável fonte de disseminação deste organismo na população animal e nos produtos de origem animal. O estudo da distribuição dos sorotipos de *Escherichia coli* em suínos abatidos e seus produtos derivados em várias

regiões do País podem mostrar a correlação existente entre eles e as cepas isoladas na população humana, correlacionando os possíveis resultados com os achados da presente pesquisa

Os dejetos industriais (fezes) oriundos de abatedouros de suínos, principalmente, onde não existe estação de tratamento de esgoto, determinam um grande impacto ambiental contaminando a microbiota telúrica, por *Escherichia coli*, podendo conter o sorogrupo O157 que é considerado patogênico para o Homem e outras espécies animais, acarretando o aparecimento de portadores deste germe que exerce importância ímpar na sanidade animal e saúde pública. Entretanto, o solo não é o único “habitat” atingido por matéria fecal, oriunda de dejetos industriais, podendo ainda contaminar fontes hídricas, galerias pluviais alterando também o ecossistema peculiar destes habitats pela possibilidade da *Escherichia coli* e seus sorogrupos adaptarem-se às novas condições ecológicas e sobreviverem em outros ambientes, cujos metabólitos podem originar substâncias potencialmente perigosas aos seres vivos e danos à microbiota. Os problemas ambientais relacionados aos resíduos dos estabelecimentos de abate de suínos, levam à necessidade de se monitorar também o destino dos despejos de rejeitos, não se esquecendo de que no interior dos estabelecimentos a implantação de boas normas de fabricação e a criação da APPCC são importantes para minimizar as contaminações cruzadas.

Os programas de monitoramento devem certificar que a saúde pública não corre perigo com as atividades agroindustriais desenvolvidas, determinar que o ambiente e seus recursos hídricos não correm riscos de danos inaceitáveis e ministrar informações que permitam aos órgãos fiscalizadores tomarem decisões sobre a continuidade, redução ou expansão do uso do ambiente para despejo de rejeitos e outras atividades.

As conseqüências ecológicas de contaminação bacteriana ambiental, principalmente por *Escherichia coli* e seus sorogrupos, têm sido documentadas na literatura científica. Vários estudos de campo e experimentação laboratorial são necessários para estabelecer efeitos imediatos e a longo prazo, como efeitos subletais.

A comunidade científica tem a responsabilidade em contribuir para solucionar e minimizar problemas ligados à produção agroindustrial, além de prover as agências de meio ambiente e inspecionadores com instrumentos eficazes de fiscalização. Desta forma, colaborar para que a sociedade disponha de meios eficazes de controle das atividades agroindustriais poluidoras e infectantes, de modo a não inviabilizar a produção necessária ao mundo moderno, através do desenvolvimento sustentável e manutenção da

biodiversidade microbiana própria de cada nicho ecológico, evitando o impacto ambiental nos diferentes ecossistemas e na biosfera.

Os objetivos foram alcançados pois enumerou-se, isolou-se *E. coli* em amostras de carne suína aptas ao consumo, após inspeção ante e “post-mortem”, como também em amostras de linfonodos mesentéricos e fezes. Identificaram-se sorogrupos de *E. coli* de maior ocorrência a partir de cepas isoladas. Compararam-se métodos para enumeração, isolamento e identificação de *E. coli*. Testou-se a atividade antimicrobiana das cepas isoladas e verificou-se a viabilidade experimental em lingüiça suína frescal do tipo toscana.

6 CONCLUSÕES

Em conformidade com os dados obtidos e discutidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- Amostras de carne suína oriundas da área de ferida de sangria que apresentaram contaminação por coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* quando analisadas pelos métodos 1 ou 2 devem ser consideradas impróprias para o consumo ou para uso industrial, entretanto a Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001) não estabelece padrões para o germe em questão.
- Todas as amostras de pleura e músculos intercostais que apresentaram ausência de coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* pela prova analítica do método 1, devem ser consideradas próprias para processamento ou consumo; entretanto aquelas em que o método 2 revelou a presença de coliformes totais e ausência de *Escherichia coli*, devem ser consideradas impróprias para o consumo ou uso industrial.
- As amostras da região sub-sacral próxima à base da cauda que possuíam coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli*, quer seja pelo método 1 e 2, conforme tabela 1, devem ser consideradas processadas em condições inadequadas na aplicação das Boas Práticas (origem da matéria prima, higiene e processamento) e não devem ser consumidas ou processadas industrialmente.
- O método 3, ao ser aplicado nas diferentes amostras permitiu revelar a confirmação de EPEC e EHEC em amostra de linfonodos e fezes, respectivamente.
- A fase de enriquecimento no método 4, independentemente do tipo de amostra analisada permitiu uma recuperação significativamente maior de colônias de *Escherichia coli*, sendo o meio Mac Lac seguido do EMB os que apresentaram maiores números de colônias isoladas. Esta fase ainda permitiu uma recuperação significativamente maior de colônias de

EPEC, EIEC, e na detecção de amostras comestíveis e não comestíveis contaminadas por grupos de *Escherichia coli*.

- As amostras de pleura e músculos intercostais analisadas não apresentaram nenhuma cepa EPEC, EIEC ou EHEC, sendo portanto consideradas em condições próprias de consumo.

- O meio ágar *Escherichia coli* O157:H7 apesar de ser indicado para isolamento e diferenciação de cepas enterohemorrágicas (EHEC) e *Escherichia coli* O157:H7, conforme ocorreu o isolamento da cepa O157:H⁻ na amostra de fezes pelo método 3, ainda ofereceu condições próprias para o isolamento de cepas EPEC em amostra de linfonodos mesentéricos.

- Todas as cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas apresentaram resistência à pelo menos sete antibióticos usados rotineiramente no tratamento das D.T.A. e foram sensíveis apenas à gentamicina e à tobramicina.

- A cepa sorotipada como EHEC O157 foi confirmada como O157:H⁻ em PCR.

- As cepas patogênicas isoladas apresentaram viabilidade em amostras de lingüiça fresca tipo toscana sendo delas re-isoladas experimentalmente.

- As amostras de lingüiça fresca tipo toscana isentas de *Escherichia coli* (controle negativo), devem possuir outros microrganismos determinadores de alterações visuais e olfativa, pelo fato dos alimentos de origem animal possuírem microbiota variável qualitativa e quantitativamente, embora não tenham sido pesquisadas tendo em vista a natureza do trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL – RAOUF, U.M.; BEUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.1999-2006, 1993.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis e enfermidades transmissíveis comuns al hombre y a los animales. Bacterioses y micosis*. Ed: Organization Panamericana de La Salud (OPS). Washington – DC – 20037 – EUA – 2001 – 398p. 2001. Publicacion Científica y Técnica n° 580.3ª ed. Vol.I

ACHESON; D.W.K.; JAEGER, J.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.21, n.23, p.183-187, 1999.

ADAM, M.R. MOSS, M.O. *Microbiologia de los Alimentos*. 1º ed. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia. 1997. 463p. Traduzido por Manuel Ramis Verges

ADAMS, M.R.; GRUBB, S.M.; HAMER, A. ; CLIFFORD, M.N. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β -glucuronidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n.4, p. 444-449, 1990.

ALEKSIC, S.; KARCH, H.; BOCKEMÜHL, J. A biotyping scheme for shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other Gram-negative bacteria. *Journal Medicine Microbiology Virology Parasitology Infective Disease*. v.276, p.221-230, 1992.

ALMEIDA, C.R. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v.12, n.53, p.12-20, 1998

ANDERSON, J.M.; BAIRD PARKER, A.C. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in foods. *Journal Applied Bacteriology*, v.39, p.111-117, 1975.

ANNON. Outbreak of gastrointestinal disease – Ontario. *Journal of Food Protection*, v.50, p.438-439, 1987.

ANTAI, S.P. ; ANOZIE, S.O. Incidence of infantile diarrhoea due to enteropathogenic *Escherichia coli* in Port Harcourt metropolis. *Journal Applied Bacteriology*, v.62, p.227-229, 1987.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *International Official Method of Analysis*, 16th ed. AOAC International. Arlington. VA. Method 991. 15, 1995.

BAGI, L.K.; BUCHANAN, R.L. Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Letter Applied Microbiology*, v.17, p.37-39, 1993.

BAUER, A.W. ; KIRBY, W.M.M.; SCHERRIS, J.C. ; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p. 493-496, 1976.

BEERY, J.T.; DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Colonization of chicken cecal by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.310-315, 1985.

BELONGIA, E.A.; OSTERHOLM, M.T.; SOLER, J.T. *et al.* Trasmision of *Escherichia coli* O157:H7 in Minnesota child day – care facilities. *Journal American Medicine Association*, v.269, p.883-888, 1993.

BERSOT, L dos S.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Avaliação bacteriológica de carne suína (carré = *Longissimus dorsi* + base óssea) comercializada em Niterói e São Gonçalo – R.J. Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.5, n.1, p.3-7, 1998.

BETTELHEIM, K.A. *Escherichia coli*. Disponível www.aciencenet.com.au. [acesso em 29.08.2002].

BEUTIN, L.M.; MONTENEGRO, M.A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMAN, S; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga – like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal Clinical Microbiology*, v.27, p. 2559-2564, 1989.

BHAN, M.K.; RAIJ, P.; LEVINE, M.M. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with persistent diarrhoea in a cohort of rural children in India. *Journal Infective Disease*, v.159, p. 1061-1064, 1989.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 17^o ed. Melhoramentos, São Paulo, 1976. 1056 p.

BITZAN, M.; LIDWIG, K.; KLEMT, M.; KONIG, H. BUREN, J.; MULLER-WIEFEL, D.E. The role of *Escherichia coli* infections in the classical (enteropathogenic) hemolytic uraemic syndrome: Results of a Central European multi-center Study. *Epidemiology Infective*, v.110, p.183-196, 1993.

BORCZYK, A.A.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; DUNCAN, L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, v.i, p.98, 1987.

BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F. ; ZUCCA, J. *Microbiologia Alimentaria. Aspectos Microbiológicos de la Seguridad e Calidad Alimentaria*. 1 ed. V.1. Zaragoza (Espanha). Acibia, 1994. 437 p. Traduzido por Victor A. Diez Fernandes.

BOUZARI, S.; VARGHESE, A. Cytolethal distending toxin (CLDT) production by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *FEMS Microbiology Letters*, v.71, p.193-198, 1990.

BRACKETT, R.E.; HAO, Y.Y. ; DOYLE, M.P. Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Journal of Food Protection*, v.57, p.198-203, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n° 46, de 10 de Fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Produtos de Origem Animal sob regime do Serviço de Inspeção Federal. 1998. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.50, p.24-28, 16 de Março de 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Circular n° 245/96 de 25 de Novembro de 1996. *Regulamenta a implantação do programa de procedimentos padrões de higiene operacional*. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n° 23 de 12 de Fevereiro de 1993. *Regulamenta a implantação dos sistema de prevenção e controle com base na análise de riscos e controle de pontos críticos*. 1993a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n° 11 de 18 de Fevereiro de 1993. *Regulamenta a implantação do sistema de prevenção e controle com base na análise de riscos e controle de pontos críticos*. 1993b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n° 13 de 03 de Março de 1993. *Regulamenta a implantação do sistema de prevenção e controle com base na análise de riscos e controle de pontos críticos*. 1993c.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Laboratório Animal. *Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos*. Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7: Capítulo 28. p.1-21, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1428 de 26 de Novembro de 1993. Regulamento técnico para inspeção de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de boas práticas de produção e prestação de serviços na área de alimentos e o regulamento técnico para o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade para produtos na área de alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n. 229, p. 18415-18419, 02 de Dezembro de 1993d. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.7-E, p. 45-53, de 10 de Janeiro de 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 304, de 22 de Abril de 1996. Introduz modificações racionais e progressivas para que se alcancem avanços em termos higiênicos, sanitários e Tecnológicos na distribuição e comercialização de carne bovina, bubalina e suína, visando principalmente à saúde do consumidor. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, v.-, n.-, p. 6856, 23 de Abril de 1996. Seção 1, pt. 1. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/port304.html> >. acesso em: 24 de Julho de 2001.

BRENNER, D.J. Family I. *Enterobacteriaceae* RAHN, 1937, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams ; Wilkins. Baltimore. MD: 1984. 964p. 2v. V. 1, p. 408-516.

BROWN, C.A.; HARMON, B.G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.27-32, 1997.

BRYANT, H.E. ATHAN, M.A. ; PAI, C.H. Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infections in an urban community. *Journal Infective Disease*. v.160, p.858-864, 1989.

BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* (In press). In: BUCHANAN, R.L. ; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Technology*., v.51, p.69-76, 1997.

BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *International Journal Food Microbiology*, v.23, p.317-322, 1994.

BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Technology*, v. 51, p. 69-76, 1997.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a single means of evaluating the acid tolerance of stationary phase cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.4009-4013, 1996.

BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, v.9, p.185-196, 1992.

BURCUM, J. *Number of Escherichia coli case rises to 30*. Disponível: jburcum@startribune. [acesso em 07 de Dezembro de 2000]

BUTEAUX, R.; MOSSEL, D.A.A. The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. *Journal Applied Bacteriology*, v.24, p.353-364, 1961.

CALDERON, D.F.; FURLANETTO, S.M.P. Análise bacteriológica de carnes suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, v.21, n.4, p.331-336, 1990.

CALDERWOOD, S.B.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T.; GRIFFIN, P.M.; STROCKBINE, N.A.; SWAMIMTHAN, B.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; KAPLAN, B.S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A.D.; OBRIG, T.G.TAKEDA, Y. TARR, P.I.; WACHSMUTH, I.K. Proposed new nomenclature for SLT(VT) Family. *ASM News*, v.62, p.118-119, 1996.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1999. p.87-148, 215-228.

CAMPOS, M.R.H.; SERAFINI, A.B. Estudo das condições microbiológicas no fluxograma de preparações de carne bovina constituintes do cardápio em um serviço de alimentação na cidade de Goiânia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. Rio de Janeiro. *Anais...* RJ.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.264.

CAPRIOLI, A.; LUZZI, I; ROSMINI, F. Hemolytic uremic syndrome and vero cytotoxin – producing *Escherichia coli* infection in Italy. The HUS Italian Study Group. *Journal Infective Disease*, v.166, p.154-158, 1992.

CARVALHO, J.C.A.P.; FRANCO, R.M. ; OLIVEIRA, L.A.T. *Enterobacteriaceae* em carne moída comercializada no Município de Magé – R.J. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., Itabuna/Ilhéus. *Anais...* BA. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 45, 1985a.

CARVALHO, J.C.A.P.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. Incidência de coliformes totais e fecais em embutido frescal (lingüiça) comercializada na cidade de Niterói. *Revista Higiene Alimentar*, v.4, n.2/3, p.136-137, 1985b.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers – Western United States, 1992 – 1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.42, p.258-263, 1993.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Escherichia coli* O157:H7 [on line]. 2000a. Disponível: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli-g.htm> [acesso em 07 de setembro de 2000].

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Diarrheagenic Escherichia coli* [on line]. 2000b. Disponível: <http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/diarrecoli-t.htm> [acesso em 02 de setembro de 2000].

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Disease Information. *Escherichia coli* O157:H7 [on line]. 2000c. Disponível: <http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli-t.htm> [acesso em 02 de setembro de 2000].

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM. South Australia, *Morbidity, Mortality Weekly Rept*, v.44, p.550-551,557-558, 1995.

CERQUEIRA, A. M.F. *Escherichia coli* em produtos cárneos crus de origem bovina comercializados na cidade do Rio de Janeiro: Detecção de fatores de virulência e avaliação da metodologia empregada na recuperação de amostras enteropatogênicas. 1993. 105p. Tese de Mestrado em microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

CERQUEIRA, A.M.F.; FRANCO, R.M. Contagem de aeróbios mesófilos viáveis e enumeração de coliformes totais e coliformes fecais em embutido cozido (mortadela) comercializado em Niterói – RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., Cuiabá, *Anais...* GO. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.227, 1986.

CERQUEIRA, A.M.F.; TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. *Journal Food Protection*, v.60, n.2, p.177-180, 1997.

CHANG, G.W.; BRILL, J.; LUM, R. Proportion of β -D-glucuronidase negative *Escherichia coli* in faecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.335-339, 1989.

CHEVILLE, A.M.; ARNOLD, K.W.; BUCHRIESER, C.; CHENG, C.M.; KASPAR, C.W. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.1822-1824, 1996.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.9, p.3462-3465, 1996.

CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2735-2740, 1996.

CLEARY, T.G.; MURRAY, B.E. Lack of Shiga-like cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Journal Clinical Microbiology*, v.26, p.2177-2179, 1988.

CODEX ALIMENTARIUS, Codex Guidelines for the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point System. Codex Alimentarius Commission. Geneva. *Printing Office*, 1973.

CONFERENCE ON FOOD PROTECTION. *Proceedings*. Washington DC. US Government Printing Office, 1971.

CRAY, W.C.; MOON, H.W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1586-1590, 1995.

CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.R. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *Journal of Food Protection*, v.57, p.97-103, 1994.

DANBARA, H.; KOMARE, K.; HIROSHI, A. Molecular analysis of enterotoxin plasmids of 14 different O serotypes. *Infective Immunity*, v.56, p.1513-1517, 1988.

DEL ROSARIO, B.A.; BEUCHAT, L.R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *Journal of Food Protection*, v.58, p.105-107, 1995.

DESTRO, M.T. Introdução e Definições do Sistema HACCP. In: *Simpósio Sistema HACCP*, Resumos: 12., 1997.

DICKSON, J.S. Control of *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef in a model spray chilling system. *Journal Food Science*, v.56, p.191-193, 1991.

DICKSON, J.S.; ANDERSON, M.E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. *Journal of Food Protection*, v.55, p.133-140, 1992.

DICKSON, J.S. Susceptibility of previsceration washed beef carcasses to contamination by *Escherichia coli* O157:H7 and salmonellae. *Journal of Food Protection*, v.58, p.1065-1068, 1995.

DI GIACOMO, R.F.; KOEPEL, T.D. Sampling for detection of infection or disease in populations. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.189, p.22-23, 1986.

DONNENBERG, M.S.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T. Epithelial cell invasion: an over-looked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherent factor. *Journal Infected Disease*, v.160, p.453-459, 1989.

DORN, C.R.; SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R. Properties of verocytotoxin – producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. *Epidemiology Infective*, v.193, p.83-95, 1989.

DOYLE, M.P.; PADYHE, V.V. *Escherichia coli*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*, Doyle, M.P. Ed. Marcel Dekker: New York and Basel, 1989.

DOYLE, M.P. ; SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied Environmental Microbiology*, v.48, p.855-856, 1984.

DOYLE, M.P. ; SCHOENI, M.P. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, p.2394-2396, 1987.

DRASAR, B.S. ; HILL, M.J. The distribution of bacterial flora in the intestine. In: DRASAR, B.S.; HILL, M.J. (ed). *Human intestinal flora*. Academic Press, London. 1974. p.36-43.

DUARTE, A.; FURUMURA, M.; LEITE, D.S.; SANTOS, A.; CAMPOS, A.B.G. Isolamento de amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e do sorogrupo O157 em produtos de laticínios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. Rio de Janeiro, 1997. *Anais...* Rio de Janeiro, p. 283.

DUBREUIL, J.D.; FAIRBROTHER, J.M. ; LALLIER, R. Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infectivity Immunity*, v.59, p.198-203, 1991.

DUGUID, J.P.; MARMION, B.P.; SWAIN, R.H.A. *Mackie and McCartney Medical Microbiology*. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1978.

DUPONT, H.L.; FORMAL, S.B; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.I.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.G.; LABRECK, E.; KALAS, J.P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New England Journal Medicine*, v.285, n.1-9, 1991.

EDELMAN, R.; KARMALI, M.A.; FLEMING, P.A. Summary of the International Symposium and Workshop of Infectons due to vero-cytotoxin (shiga – like toxin) – producing *Escherichia coli*. *Journal Infective Disease*, v.157, p.1102–1104, 1988.

EIDELS, L.; PROIA, R.L.; HART, D.A. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiology Review*, v.47, p.596-620, 1983.

ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breastfed infant. *Reviews Infective Disease*, v.13, p.352-356, 1889.

EWING, W.H. Edward's; Ewing's *Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed., Elsevier Science Publishers, New York, p.93-134, 1986.

EWING, W.H. *Diferentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reactions*. Center for Disease Control: Atlanta, 1972.

FEDERAL REGISTER. *Food Safety and Inspection Service, United State Department of Agriculture*, v.61, p.144, 1996.

FENLON, D.R. The survival of *Escherichia coli* O157 in soil and water following application of animal wastes to land. Disponível: 9907286@sms.ed.ac.mk [acesso em 10 de abril de 2001]

FENG, P.C.S.; HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, p.1320-1329, 1982.

FENG, P. ; LAMPEL, K.A.; KARCH, H.; WHITTAM, T.S. Genotype and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Infective Disease*, v.177, p.1750-1753, 1998.

FERREIRA, T.; FRANCO, R.M. OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P.; GONÇALVES, P.M.R. Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de Produtos de Origem Animal (POA) e salmoura. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., Campo Grande, 1996. *Annais...* Mato Grosso do Sul, p.285.

FERREIRA, T; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Estudo comparativo da sensibilidade a antimicrobianos pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e difusão em meio sólido, de bactérias isoladas em produtos de origem animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., Cuiabá, 1986a. *Annais...* Mato Grosso, p.231.

FERREIRA,T.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Sensibilidade de germes da família *Enterobacteriaceae* isolados de produtos de origem animal frente a antimicrobianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., Cuiabá, 1986b. *Annais...* Mato Grosso, p.232.

FISHBEIN, M.; MEHLMAN, I.J.; CHUGG, L. Coliform, fecal coliforms, *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli*. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association: Washington D.C._____ p. 1976.

FLETCHER, J.M.; SAUNDERS, J.R.; BATT, R.M.; EMBAYE, H.; GETTY, P.; HART, C.A. Attaching effacement of the rabbit enterocyte brush border is encoded on a single 96,5 Kilobase – pair plasmid in an EPEC O111 strain. *Infectivity. Immunity*, v.58, p.1316-1322, 1990.

FLORENTINO, E.R.; LEITE JUNIOR, A.F.; SÁ, S.N.; ARAÚJO, M.S.O.; MARTINS, R.S. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída comercializada em Campina Grande, P.B. *Revista Higiene Alimentar*, v.11, n.47, p.38-41, 1997.

FOOD SAFETY AND INSPECION SERVICE, MEAT AND POULTRY PRODUCTS. *Programas Integrados de Proteção de Alimentos – Reunião Interamericana Ministerial de Saúde Animal*, 200, disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/OA/news/recall9.htm#RNR>, acesso em 11 de Maio de 2001.

FSIS. Food Safety and Inspection Service – United States Department of Agriculture. USDA. *California grocery recalls ground beef products for possible Escherichia coli O157:H7 contamination* [on line]. 2000a. Disponível: http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/retail/rpr_006-2000.htm[acesso em 02 de Setembro 2000].

FSIS. Food Safety and Inspection Service – United States Department of Agriculture. USDA. *Urges consumers to use food thermometer when cooking ground beef patties* [on line]. 200b. Disponível: <http://www.fsis.usda.gov/OA/news/colorpr.htm>[acesso em 02 de Setembro 2000].

FRAMPTON, E.W.; RESTAINO, L.; BLAZKO, N. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) in a 24 hours direct plating method for *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, v.51, p.402-404, 1988.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 1996. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo. Atheneu. 1996. 182p.

FRANCO, B.D.G.M.; GOMES, T.A.T.; JAKABI, M.; MARQUES, L.R.M. Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. *International Journal Food Microbiology*, v.12, p.333-338, 1991.

FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B. E.; TRABULSI, L.R. Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. *Revista de Microbiologia*, v.16, n.1, p. 49-55, 1985.

FRANCO, R.M. *Coliformes e enterococos em charque*. 121p. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 1983.

FRANCO, R.M.; CHAVES, G.M.C. Avaliação bacteriológica da lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro – R.J. – Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* R.J.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.280.

FRATAMICO, P.M.; SCHULTZ, F.J.; BENEDICT, R.C.; BUCHANAN, R.L.; COOKE, P.H. Factors influencing attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to beef tissues and removal using selected sanitizing rinses. *Journal of Food Protection*, v.59, p.453-459, 1996.

FRATAMICO, P.M.; BUCHANAN, R.L.; COOKE, P.H. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.4245-4252, 1993.

FUZHARA, T.O. ; FRANCO, B.D.G.M. Bactérias patogênicas indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André, São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.13, n.1, p. 77-88, 1993.

GUEDES, M.L. da S.; GUEDES, J. da S. *Bioestatística para Profissionais da Saúde*. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1988. 201p.

GIANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E.J.G. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*, v.31, p.1268-1274, 1993.

GIBSON, A.M.; ROBERTS, T.A. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and salmonellae in laboratory medium. *International Journal Food Microbiology*, v.3, p.183-194, 1986.

GILL, C.O.; JONES, T. Comparison of methods for sampling and enumeration *Escherichia coli* on pig carcasses. *Food Microbiology*, v.15, n.6, p.617-623, 1998.

GILL, C.O.; PHILLIPS, D.M. The effect of media composition on the relationship between temperature and growth rate of *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, v.2, p.285-290, 1985.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C.; BADONI, M. Assessment of the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *Journal of Food Protection*, v.59, n.2, p.136-140, 1995.

GOEPFERT, J.M. The aerobic plate count, coliform and *Escherichia coli* content of raw ground beef at the retail level. *Journal Milk Food Technology*, v.39, p.175, 1976.

GOLDWATER, P.N.; BETTELHEIM, K.A. The role of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes other O157:H7 as causes of disease in Australia. *Communication Disease Intellectual*. v.19, p.2-4, 1995.

GOMES, T.A.T.; CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Diagnóstico Bacteriológico. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1999. 586p. Cap.16, p.131-141.

GOMES, T.A.T.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Genética bacteriana. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu, 1989. 386p. Cap. 4, p. 25-35.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Review*, v.13, p.60-98, 1991.

GUBASH, S.M.; ANAND, C.M.; STOKMAN, M. Inhibition of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by bromthymol blue. *Journal Clinical Microbiology*, v.26, p.2248-2249, 1988.

GUERRANT, R.L.; HUGHES, J.M.; CHANG, B. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat – stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates. *Journal Infective Disease*, v.142, p.220-227, 1980.

GUNZER, F.; BOHM, H.; RUSSMANN, H.; BITZAN, M.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *Journal Clinical Microbiology*, v.30, p.1807-1810, 1992.

GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R.; HOLMES, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat – labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infective Immunity*, v.54, p.529-536, 1986.

HAYES, P.S.; BLOM, K.; FENG, P.; LEWIS, J. STROCKBINE, N.A.; SWAMINATHAN, B. Isolation and characterization of a beta. D – glucuronidase – producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. *Journal Clinical Microbiology*, v.33, p.3347-3348, 1995.

HALDANE, D.J.M.; DAMM, M.A.S.; ANDERSON, J.S. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (Shiga-like) toxin producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Clinical Microbiology*, v.24, p.24-26, 1986

HARDIN, M.D.; ACUFF, G.R.; LUCIA, L.M.; OMAN, J.S.; SAVELL, J.W. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. *Journal Food Protection*, v. 58, p. 368-374, 1995.

HARRIGAN, W.F. *Laboratory methods in food microbiology*. 3.ed. Academic Press, 1998. 520p.

HARTMAN, P.A.; PETZEL, J.P.; KASPAR, C.W. New methods for indicator organisms. In PEARSON, M.D.; STERN, N.J. (Eds.) *Microrganisms and their toxins: Developing Methodology*. Marcel Dekker: New York and Basel, 1986.

HENGGE – ARONIS, R.; LANGE, R.; HENNEBERG, N.; FISCHER, D. Osmotic regulation of *rpoS* – dependent genes in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, v.175, p.259-265, 1993.

HILL, S.M.; PHILLIPS, A.D.; WALKER-SMITH, J.A. Antibiotics for *Escherichia coli* gastroenteritis. *Lancet*, v.i, p.771-772, 1988.

HILL, W.E.; FERREIRA, J.L.; PAYNE, W.L.; JONES, V.M. Probability of recovering pathogenic *Escherichia coli* from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.6, p.1374-1378, 1985.

HIROYAMA, T. ITO, H.; TAKEDA, Y. Inhibition by the protein kinase inhibitors isoquinolinesulfonamides, of fluid secretion induced by *Escherichia coli* heat – stable enterotoxin, 8 – bromo – c GMP and 8 – bromo – c AMP in suckling mice. *Microbiology Pathology*, v.7, p.255-261, 1989.

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS, W.D.; RIPPEY, S.R. ; CHANDLER, L.A. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. 1995 (Revision A / 1998). Arlington. Cap 4. p. 401-406.

HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A. ; TODD, E.C.D. Coliforms, *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3^oed. Washington. American Public Health Association (APHA) 1992. 1219p. Cap. 24, p. 325-369.

HOBBS, B.C; ROBERTS, D. *Toxinfecções e controle higiênico sanitário de los alimentos*. 6^oed. São Paulo. Varela, 1999. 376p.

HOLBROOK, R.; ANDERSON, J.M.; BAIRD PARKER, A.C. Modified direct plate method for counting *Escherichia coli* in foods. *Food Technology Aust.*, v.32, p.78-83, 1980.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th. Baltimore, Maryland; Willians and Wilkins, 1994. 787p. v.2.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial ecology of foods. factors affecting life and death of microrganisms*. Academic Press: London, 1980. V.1.

JAKABI, M.; FRANCO, B.D.G.M. Frequência de isolamento de cepas de *Escherichia coli* patogênica em alimentos de origem animal. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n.11, p.170-181, 1991.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. *Medical Microbiology*, 20. ed. Connecticut: Appleton e Lange, 1995. 656p.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. 803p.

JOHNSON, R.P.; CRAY, Jr, W.C.; JOHNSON, S.T. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infectivity Immunity*, v.64, p.1879-1883, 1996.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; BEZANSON, G.S. Citotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colits in Canada. *Lancet*, v.i, p.76, 1983

KAMPELMACHER, E.H.; EDEL, W.; GUINÉE, P.A.M.; VAN NOORLE JANSEN, L.M. Experimental *Salmonella* infections in pigs. *Zentralblatt Veterinaermedizin*, v.B16, p.717, 1969.

KAPER, J.B. *Presentation to Society for General Microbiology*: Durham, 1987.

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

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic – uremic syndrome, haemorrhagic colitis. *Lancet*, v.ii, p.1299-1300, 1983.

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

KLEANTHOUS, H.; FRY, N.K.; SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; ROWE, B. The use of sorbitol – MacConkey agar in conjunction with a specific antiserum for the detection of verocytotoxin – producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology Infective*, v.101, p.327-335, 1988.

KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. *ASM News*, v. 59, p. 247-250, 1993.

KNUTTON, S.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; McNEISH, A.S. Role of plasmid – encoded virulence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP – 2 cells. *Infective. Immunity*, v.55, p.78-85, 1987.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*. Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicator In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington. APHA, 2001. 676p. Cap. 8, p.69-82

KORSAK, N.; DAUBE, G.; GHAFIR, Y.; CHAHED, A.; JOLLY, S.; VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *Journal of Food Protection*, v.61, n.5, p.535-541, 1998.

KRIEG, N.R. ; HOLT, J.G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ; Wilkins, 8th, Baltimore M.D. 1984. 964p. v.1.

KUNKEL, S.L. ; ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat – labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infectivity. Immunity.*, v.25, p. 586-596, 1979.

LAUBACH, C.; RATHGEBER, J.; OSER, A.; PALUMBO, S. Microbiology of the swine head meat deboning process. *Journal of Food Protection*, v. 61, n.2, p.249-252, 1998.

LAUTROP, H.; ORSKOV, I.; GAARSLEV, K. Hydrogen sulphide producing variants of *Escherichia coli*. *Acta Pathology Microbiology Scand. B*, v.79, p.641-650, 1971.

LAYNE, P. HU, A.S; BALOWS, A.; DAVIS, B.R. Extrachromosomal nature of hydrogen sulfide production in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, v.106, p.1029-1030, 1971.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic e enteroadherent. *Journal Infective Disease*, v.155, p.377-389, 1987.

LEVINE, M.M.; NATARO, I.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E; CLEMENTS, M.L. ; O'BRIEN, A.D. The diarrhoeal response of humans to some classic serotypes of *Escherichia coli* is dependent on enteroadhesiveness factor. *Journal Infective Disease*, v.152, p. 550-559, 1985.

LEVINE, M.M.; XV, J.; KAPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATAN, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA – probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal Infective Disease*, v.156, p.175-182, 1987.

LEYER, G.J.; WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3752-3755, 1995.

LIOR,H. *Escherichia coli* O157:H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (vtec). *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.14, p.378-382, 1994.

LOKEN, J.K. *The HACCP food safety manual*. John Willey, Sons, Inc., New York. 1998. 318p.

MARCH, S.B.; RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Journal Clinical Microbiology*, v.23, p.869-872, 1986.

MARKS, S.; ROBERTS, T. *Escherichia coli* O157:H7 ranks as fourth most costly foodborne disease. Special Reprint from *Food Review*, v.16, p.3, 1993.

MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, J.G.; POTTER, M.E. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, v.ii, p.1043, 1986.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology – Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1987. 343p.

MARTINS, A.M.B.; RIBEIRO, E.G.A.; OLIVEIRA, M.A. de ; OLIVEIRA, S.A.V. de; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GELLI, D.S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de lingüiças consumidas em Ribeirão Preto/S.P. e Região. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* R.J.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.268.

MARTINS, S.C.S.; SOARES, J.B.; MÜLLER, M. de M. Qualidade sanitária da lingüiça defumada comercializada em Fortaleza. *Revista Higiene Alimentar*, v.7, n.25, p.35-36, 1993.

McGOWAN, K.L. WICKERSHAM, E. ; STROCKBINE, N.A. *Escherichia coli* O157:H7 from water. *Lancet*, v.i, p.967-968, 1989.

McNALLY, A. Genotyping and phenotypic profiling of bovine and human *Escherichia coli* O157 isolates. Disponível: 9907286@sms.ed.ac.UK [acesso em 10 de Abril de 2001].

MEHLMAN, I.J.; LOVETT, J. Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods of recovery from foods. *Food Technology*, v.36, p.73-79, 1984a.

MEHLMAN, I.J.; LOVETT, J. Enteropatogenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological Analytical Manual* 4th ed. Food and Drug Administration. Virginia. US. 1984c. p. 6-01.

MEHLMAN, I.J.; LOVETT, J. *Escherichia coli* In: *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists : Arlington. 1984b.

MEHLMAN, I.J.; ROMERO, A. *Escherichia coli*: recovery from foods. *Food Technology*, v.36, p.73-79, 1982.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v.51, p.179-184, 1994.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. 4ed. Washington APHA, 2001. 676 p. Cap. 35, p.331-341.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P.; JOSEPH, S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *Journal of Food Protection*, v 61, n.11, p.1511-1514, 1998.

MERCK. *Manual de Cultivo*. E. Merck. Darmstadt, Alemanha: 364p., 1994

MERCK. *Microbiology Manual Cultura Media*. Dormstadt, Germany, 405p., 1996.

MESSER, J.W.; MIDURA, T.F.; PEELER, J.T. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3° ed. American Public Health Association (APHA), Washington, 1992. 1219 p. Cap. 2, p. 25-49.

MILIDIS, M.D.; KOORNHOF, H.J.; PHILLIPS, J.I. Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in a vitro Henle 407 cell model. *Infectivity Immunity*, v.57, p. 1928-1935, 1989.

MILLER, L.G. ; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 acid – tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*, v.57, p.460-464, 1994.

MONTENEGRO, M.A.; BALTE, M.; TRUMPT, T.; ALEKASIC, S. Detection and characterization of fecal verotoxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *Journal Clinical Microbiology*, v.28, p.1417-1421, 1990.

NATIONAL CONFERENCE ON FOOD PROTECTION. *Proceedings*. Publ: 1712-0134 Washington. DC. US, Government Printing Office, 1971.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Generic HACCP for raw beef National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *US Dept. of Agriculture Food Microbiology*, v.10, p.449-488, 1993.

NICOLETTI, M.; SUPERTI, F.; CONTI, C. Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhoea in Somalia. *Journal Clinical Microbiology*, v.26, p. 524-526, 1988.

O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga – like toxins. *Microbiology Reviews*, v.51, p. 206-220, 1987.

O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type I – like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal Infective Disease*, v.146, p.763-769, 1982.

O'BRIEN, S.J.; VETEC: How important is it? Disponível: 9907286@sms.ed.ac.uk [acesso em 10 de Abril de 2001].

OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; BENNETT, B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *Journal of Food Protection*, v.53, p.249-252, 1990.

OLIVEIRA, K.M.P.; BIDÓIA, A.D; NAKANO, M.H.; VENTURINI, S.; OLIVEIRA, T.C.R.M. de. Avaliação bacteriológica de lingüiça fresca de porco, salame e mortadela comercializados na região de Maringá – PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., Poços de Caldas. *Anais...* M.G: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996, p.72.

OLIVEIRA, L. C. Relacionamento indústria/Inspeção Federal. In: ciclo de palestras sobre a indústria da carne. São Paulo. *Apostila ...* Sociedade Paulista de Medicina Veterinária. Comissão Científica. 1984. 154p.

OLIVEIRA, L.A.T.; FERREIRA, T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Enumeração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializadas em Niterói – RJ. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.63, p.49-55, 1999.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*, In: BERGN, T. (ed.) *Methods in Microbiology*. 1984. Cap. 14, p. 43-112, Academic Press. London.

ORSKOV, F. Genus I. *Escherichia coli*. CASTELLANI AND CHALMERS 1919. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ; Wilkins. Baltimore. MD: 1984. 964p. 2v. V.1, p.420-423.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; VILLON, J.A. Cattle as a reservoir of verotoxin – producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, v.ii, p.276, 1987.

OSTROFF, S.M.; TARR, P.I.; NEILL, M.A. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli*, O157:H7 infections. *Journal Infective. Disease*, v.160, p.994-998, 1989.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*. v.55, p.555-565, 1992.

PAI, C.H. AHMED, N.; LIOR, H. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin – producing *Escherichia coli*: A two year prospective study. *Journal Infective Disease*, v.157, p.1054-1057, 1988.

PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *Journal of Food Protection*, v.49, p.1003-1009, 1986.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Detecntion and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *stxA*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* *hlyA*, *rfbO111* e *rfb0157*. *Journal Clinical Microbiological*, v.36, n.2, p.598-602, 1998

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

PAVIA, A.T.; NICHOLS, C.R.; GREEN, D. Haemolytic uraemic syndrome (HUS) following an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection: leukocytosis as a predictor and sulfonamide exposure as a risk factor. Abstracts 28th *Interscience Symposium Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 369 A. American Society for Microbiology: Los Angeles, 1988.

PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. The most probable number technique. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3^o ed. American Public Health Association (APHA), Washington, 1992. 1219 p. Cap.6, p.105-120.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: Conceitos e aplicação*: Makron books, São Paulo. 2^oed. v.2, 1997. 517p.

PERRY, C. A.; HAJNA, A. A. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and *Escherichia coli*. *American. Journal. Public Health*, v.34, p.735-738, 1944.

PETRI, C.M.; ANTUNES, L.A.F.; SARIDAKIS, H.D. *Escherichia coli* em produtos cárneos comercializados em Londrina. PRI: frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC). *Revista de Microbiologia*, v.20, n.4, p.421-426, 1989a.

PETRI, C.M.; ANTUNES, L.A.F.; SARIDAKIS, H.D. *Escherichia coli* em produtos cárneos comercializados em Londrina – P.R. II: Frequência de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). *Revista de Microbiologia*, v.20, n.4, p.427-431, 1989b.

PICKERING, L.K.; DUPONT, H.L.; EVANS, D.G. Isolation of enteric pathogens from asymptomatic students in the United States. *Journal Infective Disease*, v.135, p.1003-1005, 1977.

PIDDOCK, L. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *Journal Antimicrobial Chemother*, v.18, p.1-3, 1996.

PIERONI, P.; WANABEC, E.A.; PARANCHYCH, W.; ARMSTRONG, G.D. Identification of a human erythrocyte receptor for colonization factor antigen 1 pili expressed by H00407 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infective Immunity*, v.56, p.1334-1340, 1988.

PINTO, J.P.A.N.; CASTRO, A.P.; OHASHI, F.H.; AMARAL, G.P. Avaliação microbiológica de produtos embutidos encaminhados ao Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.69-70, 1999.

PROBAC DO BRASIL. *Produtos Bacteriológicos* Ltda. Meios para identificação de enteropatógenos. Soros para identificação bacteriana. São paulo. Brasil, 1998.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE (PHLS). *Escherichia coli* – Vero Citotoxin Producing (VTEC) Information. Disponível: 9907286@sms.ed.ac.uk [acesso em 10 de Abril de 2001].

RADU, S; MUTALIB, S.A.; RUSUL, G.; AHMADI, Z.; MORIGAKI, T.; ASAL, N.; KIM, Y.B.; OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.3, p.1153-1156, 1998.

RAJKNOWSKI, K.T.; MARMER, B.S. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *Journal of Food Protection*, v.58, p.1307-1317, 1995.

RALL, V.L. M.; PEDROSO, D.M.M.; HEIDTMAN, S.; GAMBA, R.C.; IARA, S.T. Qualidade microbiológica da carne consumida em hospitais da cidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* R.J.: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.273.

RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Jornal Clinical Microbiology*, v.26, p.2006-2012, 1988.

REIS, M.H.L.; VASCONCELOS, J.C.; TRABULSI, L.R. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.39, p.270-271, 1980.

RILEY, L.W. The epidemiological, clinical and microbiologic features of haemorrhagic colitis. *Annual Review Microbiology*, v.41, p. 383-408, 1987.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOLT, H.M.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, v.308, p.681-685, 1983.

ROBERTS, D.; HOOPER, W.; GREENWOOD, M. *Practical Food Microbiology*. London: Public Health Laboratory Service, 1995.

ROBINS-BROWNE, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhoea. *Revised Infective Disease*, v.9, p.28-53, 1987.

ROBSON, W.L.; LEUNG, A.K.; MONTGOMERY, M.D. Causes of death in hemolytic uremic syndrome. *Child Nephrology Urology*, v.11, p.228-233, 1991.

ROWBURY, R.J. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and other enterobacteria. *Letter Applied Microbiology*, v.20, p.333-337, 1995.

ROWBURY, R.J.; LAZIM, Z.; GOODSON, M. Regulatory aspects of alkali tolerance induce in *Escherichia coli*. *Letter Applied Microbiology*, v.22, p.429-432, 1996.

RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W. *Escherichia coli* O157:H7 in a nursing home: clinical, epidemiologic and pathological findings. *Journal Infective Disease*, v.154, p.631-638, 1986.

SABIONI, J.G.; MAIA, A.R.P.; LEAL, J.A. Avaliação microbiológica de lingüiça frescal comercializada na cidade de Ouro Preto, M.G. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.110-113, 1999.

SACK, R.B. Human diarrhoeal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annual Review Microbiology*, v.29, p.333-353, 1975.

SACK, R.B.; SACK, D.A.; MEHLMAN, I.J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *Journal Infective Disease*, v.135, p.313, 1977.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; SAITO, M. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhoea in children and adults. *Japanese Journal Medical Science Biological*, v.20, p.387, 1967.

SALMON, R. VT + *Escherichia coli* O157: *Current recommendations to protect Public Health*. Public Health Laboratory Service in Wales, Communicable Disease Surveillance Centre. Disponível: 9907286@sms.ed.ac.uk[acesso em 10 de Abril de 2001].

SALMON, R.L.; FARREL, I.D.; HUTCHINSON, J.G.P. *et al.*, A christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology Informative*, v.103, p.249-254, 1989.

SALYERS, A.A.; AMABILE-CUEVAS, C.F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents Chemother*, v.41, n.11, p.2321-2325, 1997.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M.; LI, L.Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiologia Reviews*, v.59, n.4, p. 579-590, 1995.

SAMADPOUR, M.; LISTON, J.; ONGRETH, J.E.; TARR, P.I. Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in food and calf Fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.1212-1215, 1990.

SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M. L.M.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* strains producing LT toxin isolated from processed food. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.13, n.3, p.236-241, 1982.

SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *Infectivity. Immunity*, v.45, p.534-536, 1982b.

SCHLAGER, T.A.; GUERRANT, R.L. Seven possible mechanisms for *Escherichia coli* diarrhoea. *Disease Clinical North American*, v.2, p.607-624, 1988.

SCHOENI, J.L.; DOYLE, M.P. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti *Campylobacter jejuni* metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.664-670, 1992.

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, v.ii, p.885-886, 1985.

SENERVA, D.; OLSVIK, O.; MUTANDA, L.N. Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation with the clinical history of the children. *Journal Clinical Microbiology*: v.27, p.2539-2543, 1989.

SHUTERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*. v.25, p.29-49, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo. Varela, 1997. 295p.

SILVA, R. M.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Correlation of invasiveness with plasmid in enteroinvasive strains of *Escherichia coli*. *Journal Infective Disease*, v.146, p.708, 1982.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J.L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of rpos and growth pH. *Journal Bacteriology*, v.176, p.1729-1737, 1994.

SMALL, P.L.C. ; FALKON, S. Identification of regions on a 230 – K base plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into Hep – 2 cells. *Infective Immunity*, v.56, p.225-229, 1988.

SMITH, H.R.; SCOTLAND, R.; WILLSHAW, G.A. Verocytotoxin and presence of VT genes in *Escherichia coli* strains of origin animal. *Journal General Microbiology*, v.134, p.829-834, 1988.

SMITH, H.W. The development of the bacterial flora of the feces of animal and man: The changes that occur during ageing. *Journal Applied Bacteriology*, v.24, p.235, 1961.

SMITH, H.W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *Journal Pathology Bacteriology*, v.90, p.495, 1965.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*. 6.ed. Iowa: The Iowa State University Press, 1967. 593p.

SOMERS, E.B.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Microbiology*, v.22, p.269-276, 1994.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: The effects of temperature, pH and sodium nitrite. *International Journal Food Microbiology*, v.25, p.29-49, 1995.

SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; JEAN, A. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. *Journal of Food Protection*, v.49, n.10, p.768-772, 1986.

TAMMINGA, S.K.; BEUMER, R.R.; KAMPELMACHER, E.H. Microbiological studies on hamburgers. *Journal Hygiene*, v.88, p.125, 1982.

TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostics, and epidemiological aspects of human infection. *Clinical Infective Disease*, v.20, p.1-10, 1995.

TAVARES, W. *Manual de Quimioterápicos Antinfeciosos*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 770p.

TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O. Clinical and microbiological features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridisation. *Journal Clinical Microbiology*, v.26, p.1362-1366, 1988.

THATCHER, F.S.; CLARCK, D.S. *Analisis Microbiológico de los Alimentos*. Zaragoza, Acribia. 1973. 271p.

THOREN, A; WOTDE-MARION, T.; STINZING, G. Antibiotics in the treatment of gastroenterites caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal Infective. Disease*, v.141, p.27-31, 1980.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM modificação do meio Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista de Microbiologia*, v.13, p.309-315, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILI um meio para a realização dos testes de mobilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista de Microbiologia*, v.13, p.230-235, 1982b.

TOWNSEND, D.E.; IRVING, R.; SMITH, K.; NAQUI, A. *et al.* A new test for the detection and quantification in the total coliform and *Escherichia coli* concentration in food. *IDEXX Laboratories*, Inc. Westbrook, ME. USA, 1996.

TOWNSEND, D.E.; IRVING, R.L.; NAQUI, A. Comparision of the simplate coliform and *Escherichia coli* test with petrifilm, three-tube MPN and VRBA+MUG methods for enumerating coliforms and *Escherichia coli* in food. *Journal of Food Protection*, v.61, n.4, p.444-449, 1998.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Resistência bacteriana à drogas. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia* 2.ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu, 1989. 386p. Cap13, p.85-89.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A.G. Traditional and non tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Revista de Microbiologia*, v.27(supl. 1), p.1-6, 1996.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE: APHIS: VS. *Escherichia coli* O157:H7 issues and ramifications. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Fort Collins, Colorado. 1994.

VALLE, R.P. Resíduos de antibióticos em alimentos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.7, n.7, p.206-208, 1985.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 3^oed. American Public Health Association (APHA), Washington, 1992. 1219 p.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Foodborne pathogens. An illustrated text*. Marison Publishing, 1996. 501p.

VENKATESWARAN, K.; MURAKOSHI, A.; SATAKE, M. Comparision of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.7, p.2236—2243, 1996.

VENKATESWARAN, K.; MURAKOSHI, A.; SATAKE, M. Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.16, p.2236-2243, 1996.

VIAL, P.; ROBINS – BROWNE, R.; LIOR, H. Characterization of enteroadherent – aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrhoea disease. *Journal Infective Disease*, v.158, p.70-78, 1988.

VIESTEL, M.A.D.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.T.A.; CARVALHO, J.C.A.P. Avaliação bacteriológica de lingüiça de frango comercializada no município de Niterói – RJ – Brasil e a sensibilidade das bactérias isoladas frente a antimicrobianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro. *Anais...* RJ: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p.268.

VSAI, L.; SPEZIDE, P.; BOZZINI, S. Binding of collagens to an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Infective Immnity*, v.58, p.449-455, 1990.

WALMER – TOUWS, D. VTEC – is it a food-borne zoonosis? *Journal of Food Protection*, v.53, p.258-261, 1990.

WATKINS, W.D.; RIPPEY, S.R.; CLAVET, C.R. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.1874-1875, 1988.

WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; JINNEMN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Journal of Food Protection*, v. 58, p. 712, 1995.

WILLSHAW, G.A.; THIRLWELL, J.; JONES, A.P.; PARRY, S.; SALMON, R.L.; HICHEY, M. Verocitotoxin – producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colits and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology*, v.19, p.304-307, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION SCIENTIFIC WORKING GROUP. *Escherichia coli* diarrhea. *Bulletin W.H.O.*, v.58, p.23-36, 1980.

WUETHERICH, B. Back on the farm: stopping *Escherichia coli* O157:H7 at its source. *ASW News*, v.60, p.409, 1994.

XAVIER, G.M.; MARTINS, M.L.L.; De ALMEIDA, L. Ocorrência de coliformes e de bolores e leveduras em carne moída comercializada em Campos dos Goytacazes. R.J. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.35-36, 1999.

YAM, C.W.; LUNG, M.L.; Ng, M.H. Clonal origin, restricted natural distribution and conservation of virulence factors in isolates of enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroups O126. *Journal Clinical Microbiology*, v.26, p.1477-1481, 1988.

ZADIK, P.M.; CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiological*, v.39, p.155-158, 1993.

ZHAO, T. ; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonese. *Journal and Food Protection*, v.57, p.780-783, 1994.

8 APÊNDICES

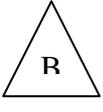
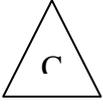
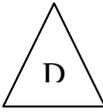
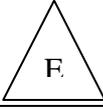
TABELA 1 – Resultados das análises de Número Mais Provável pelos métodos 1 e 2 das amostras oriundas da região interna da papada correspondente a área da ferida de sangria (FS); da região da cavidade torácica entre 4^a a e a 7^a costelas (pleura e músculos intercostais) (CT) e da cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda) (CP) / grama

Amostras	Método 1						Método 2					
	Coliformes			Coliformes fecais/ <i>Escherichia coli</i>			Coliformes totais			<i>Escherichia. coli</i>		
	FS	CT	CP	FS	CT	CP	FS	CT	CP	FS	CT	CP
1	33	<2	1600=1633	33	<2	1600=1633	26	0	58=84	16	0	28=44
2	46	<2	920=966	33	<2	540=573	28	0	50=78	18	0	26=44
3	<2	<2	1600=1600	<2	<2	1600=1600	0	0	276=276	0	0	68=68
4	<2	<2	920=920	<2	<2	350=350	0	0	232=232	0	0	195=195
5	<2	<2	23=23	<2	<2	8=8	0	0	2=2	0	0	2=2
6	<2	<2	46=46	<2	<2	17=17	2	2	8=12	2	0	4=6
7	<2	<2	46=46	<2	<2	21=21	0	0	6=6	0	0	2=2
8	<2	<2	70=70	<2	<2	31=31	0	0	12=12	0	0	2=2
9	13	<2	13=26	8	<2	8=16	5	0	2=7	1	0	1=2
10	17	<2	46=63	11	<2	33=44	10	2	8=20	8	0	6=14
11	<2	<2	22=22	<2	<2	22=22	0	0	8=8	0	0	2=2
12	<2	<2	79=79	<2	<2	33=33	0	0	16=16	0	0	8=8
13	2	<2	110=112	<2	<2	94=94	0	0	30=30	0	0	22=22
14	<2	2	2=4	<2	<2	2=2	0	0	0=0	0	0	0=0
15	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
16	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
17	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
18	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
19	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
20	<2	<2	<2=0	<2	<2	<2=0	0	0	0=0	0	0	0=0
Σ	111	2	5497=5610	85	0	4359=4444	71	4	708=783	45	0	366=411
\bar{x}	5,55	0,1	274,85=280,5	4,25	0	217,95=222,22	3,55	0,2	35,4=39,15	2,25	0	18,3=20,55

TABELA 2 – Desvio padrão, mediana, coeficiente de variação e média dos NMP das bactérias por tratamento, baseados nos dados da tabela 1

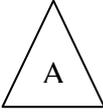
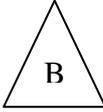
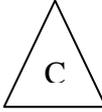
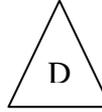
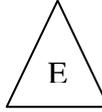
Bactéria/Método	Desvio Padrão	Mediana	Coeficiente de variação	Média/Log
Coliformes/1	536,40	36,00	1,91	280,5/0,2565
Coliformes fecais- <i>E.coli</i> /1	497,60	19,00	2,23	222,2/0,2670
Coliformes/2	77,62	7,50	1,98	39,15/0,2362
<i>E. coli</i> /2	45,23	2,00	2,20	20,55/0,1646

TABELA 3 – Número de colônias de *Escherichia coli* (EPEC e EHEC) isoladas de amostras de suínos pelo Método 3

Tipo de Amostra	Método 3	n° total de colônias confirmadas	n° de UFC de <i>Escherichia coli</i> pertencentes a categoria das		Total
			EPEC	EHEC	
Região interna da papada correspondente à área de ferida de sangria		18	0	0	0
Cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais)		20	0	0	0
Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)		24	0	0	0
Linfonodos mesentéricos (região íleo-ceco-cólica)		36	1	0	1
Fezes (região íleo-ceco-cólica)		48	0	1	1
Total		146	1	1	2

Método 3: Caldo Lauril Sulfato (CLS), Agar *Escherichia coli* O157:H7

TABELA 4 – Número de colônias de *Escherichia coli* isoladas em meios por plaqueamento direto (1) e por enriquecimento (2) no Método 4

Semeadura	Meio de cultura	Nº total de colônias de <i>Escherichia coli</i> confirmadas por tipo de amostra					Média *
		 A	 B	 C	 D	 E	
(1)	EMB	6	0	10	12	18	9,2 ^a
	MAC LAC	4	0	6	6	24	8,0 ^a
	MAC SOR	2	0	0	11	12	5,2 ^a
	TC-SMAC	0	0	0	0	0	0,0 ^a
	O157:H7	0	0	0	0	12	2,4 ^a
	HC 35°C	4	0	0	6	24	6,8 ^a
	HC 44,5°C	4	0	0	6	12	4,4 ^a
Sub total		20	0	16	41	102	
(2)	EMB	28	30	22	33	30	28,6 ^b
	MAC LAC	26	24	48	42	42	36,4 ^b
	MAC SOR	16	20	34	42	36	29,6 ^b
	TC-SMAC	2	6	10	0	6	4,8 ^c
	O157:H7	11	22	57	48	36	34,8 ^b
	HC 35°C	7	30	28	27	42	26,8 ^{b,d}
	HC 44,5°C	11	21	39	30	36	27,4 ^{b,c,d}
Sub total		101	153	238	222	228	
Total		121	153	254	263	330	

EMB = Agar “Eosin Metilen Blue”

MAC LAC = Agar MacConkey Lactose

MAC SOR = Agar MacConkey Sorbitol

TC-SMAC = Agar TC-SMAC

O157:H7 = Agar *E coli* O157:H7

HC = Agar Colite Hemorrágica

* Letras iguais: não há diferenças; e letras diferentes: têm diferenças estatísticas significantes (p<0,05)

(1) Semeadura direta (2) Enriquecimento

TABELA 5 – Ocorrência de colônias H₂S (+) e de sorogrupos de *Escherichia coli* em amostras suínas por região de obtenção

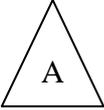
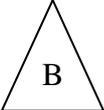
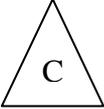
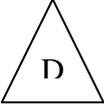
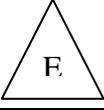
Amostra n=20/Tipo	Total de colônias suspeitas	colônias H ₂ S (+)	colônias (+) nos T.B.	Sorologia			
				EPEC	EIEC	EHEC	Total
	540	359	181	2	0	0	2
	306	127	179	0	0	0	0
	498	174	324	0	2	0	2
	426	127	299	6	0	0	6
	528	150	378	4	2	1	7
	2298	937	1361	12	4	1	17

TABELA 6 – Sorogrupos de *Escherichia coli* considerados patogênicos isolados de meios de cultura seletivos indicadores

Meios de cultura	Sorogrupos						Total
	EPEC C		EPEC B		EIEC A	EHEC	
	O86	O126	O128	O125	O29	O157	
Agar EMB	1	1	-	-	-	-	2
Agar MacConkey Lactose	2	-	-	-	1	-	3
Agar MacConkey Sorbitol	1	-	1	1	2	-	5
Agar <i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	1	1	2	-	1	5
Agar HC 35°C	-	-	1	-	-	-	1
Agar HC 44,5°C	-	-	-	-	1	-	1
	4	2	3	3	4	1	17

Agar EMB: Agar Eosin Methylen Blue

Agar HC: Agar Hemorrhagic Colitis

TABELA 7 – Ocorrência de colônias H₂S (+) e de sorogrupos de *Escherichia coli* identificados nos diferentes métodos analíticos bacteriológicos aplicados

Método	Total de colônias suspeitas	Colônias H ₂ S (+)	colônias (+) nos T.B.	Sorologia			
				EPEC	EIEC	EHEC	Total
Mét.1 CT	66	39	27	0	0	0	0
Mét.1 CF	78	17	61	0	0	0	0
Mét.2*	0	0	0	0	0	0	0
Mét.3	264	118	146	1	0	1	2
Mét.4A	306	121	185	2	1	0	3
Mét.4B	1584	642	942	9	3	0	12
	2298	937	1361	12	4	1	17

* Mét2 foi excluído da análise estatística por diferença discrepante dos demais, por apresentar valores iguais a zero.

Método	Desvio padrão	Mediana	Média * *
Mét.1 CT	27,386	33,00	33,00 a
Mét.1 CF	36,56	39,00	39,00 a
Mét.3	107,57	132,00	132,50 a
Mét.4A	126,43	153,00	153,75 a,b
Mét.4B	653,36	792,00	795,00 b

* * Letras iguais; não há diferenças; e letras diferentes: têm diferenças estatísticas significativas (p<0,05)

TABELA 8 – Eficiência dos diferentes tipos de meios empregados no método 4 (semeadura direta e enriquecimento) nos diferentes tipos de amostras, para isolamento de *E. coli*

Tipo de amostra	Tipo de semeadura	EMB	Mac Lac	Mac Sorb	TC-Smac	O157:H7	HC35°C	HC44,5°C	Total (colônias)
A	Direta	6	4	2	0	0	4	4	20
	Enriquecimento	28	26	16	2	11	7	11	101
B	Direta	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enriquecimento	30	24	20	6	22	30	21	153
C	Direta	10	6	0	0	0	0	0	16
	Enriquecimento	22	48	34	10	57	28	39	238
D	Direta	12	6	11	0	0	6	6	41
	Enriquecimento	33	42	42	0	48	27	30	222
F	Direta	18	24	12	0	12	24	12	102
	Enriquecimento	30	42	36	6	36	42	36	228
Total		189	222	173	24	186	168	159	1121

Meio de cultura	Desvio padrão	Mediana	Média *
EMB	4,09	30,00	26,6 a
Mac Lac	10,71	42,00	36,4 a
Mac Sorb	11,08	34,00	29,6 a
TC-Smac	3,89	6,00	4,8 b,c
O157:H7	18,70	36,00	34,8 a,c
HC 35°C	12,59	28,00	26,8 a
HC 44,5°C	11,45	30,00	27,8 a

* Letras iguais: não há diferenças; e letras diferentes; têm diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)

Tabela 9 - Isolamento de *Escherichia coli* enteroinvasoras e enterohemorrágicas provenientes de amostras de origem suína

Amostra	Sorologia / Cinco colônias analisadas		Total
	EIEC A	EHEC	
Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)	2*	0	2
Fezes (região íleo-ceco-cólica)	2*	0	2
Fezes (região íleo-ceco-cólica)	0	1* *	1
Total	4*	1* *	5

* Sorogrupo O29

* * Sorogrupo O157:H

H Significa sorogrupo sem motilidade

TABELA 10 – Comportamento das 17 cepas de *Escherichia coli* isoladas e sorotipadas como patogênicas frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Nº(%) de cepas resistentes	Nº(%) de cepas sensíveis
Amicacina(AC)	4(23,5%)	13(76,5%)
Ampicilina(A)	4(23,5%)	13(76,5%)
Carbenicilina(CA)	17(100%)	0(0%)
Cefalexina(CN)	8(47,1%)	11(52,9%)
Cefalotina(C)	5(29,4%)	12(70,6%)
Cefotaxina(CT)	13(76,5%)	4(23,5%)
Cefoxitina(CX)	5(29,4%)	12(70,6%)
Ceftazidina(CZ)	17(100%)	0(0%)
Ceftriaxona(R)	13(76,5%)	4(23,5%)
Ciprofloxacina(CP)	2(11,8%)	15(88,2%)
Clindamicina(CI)	17(100%)	0(%)
Cloranfenicol(CL)	17(100%)	0(%)
Eritromicina(E)	17(100%)	0(%)
Gentamicina(GE)	0(0%)	17(100%)
Netilmicina(NT)	1(5,9%)	16(94,1%)
Nitrofurantoina(F)	14(82,4%)	3(17,6%)
Norfloxacina(Fx)	9(53,0%)	8(47,1%)
Oxacilina(O)	15(88,2%)	2(11,8%)
Penicilina(P)	17(100%)	0(0%)
Rifampicina(RI)	17(100%)	0(0%)
Tetraciclina(CT)	12(70,6%)	5(29,4%)
Tobramicina(TO)	0(0%)	17(100%)
Trimetropin sulf.(B)	8(47,1%)	9(53,0%)
Vancomicina(V)	16(94,1%)	1(5,9%)

TABELA 11 – Comportamento de três cepas de *Escherichia coli* (Tipo I) não patogênicas isoladas dos diferentes locais de colheita: ferida de sangria, cavidade torácica, cavidade pélvica, linfonodos e fezes frente aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Ferida de sangria		Cavidade torácica		Cavidade pélvica		Linfonodos		Fezes	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Amicacina (AC)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Ampicilina (A)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)
Carbenicilina (CA)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Cefalexina (CN)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Cefalotina (C)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Cefotaxina (CT)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Cefoxitina (CX)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Ceftazidina (CZ)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Ceftriaxona (R)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Ciprofloxacina (CP)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Clindamicina (Cl)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Cloranfenicol (CL)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Eritromicina (E)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Gentamicina (GE)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Netilmicina (NT)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Nitrofurantoina (F)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Norfloxacina (Fx)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Oxacilina (O)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Penicilina (P)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)
Rifampicina (RI)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Tetraciclina (CT)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)
Tobramicina (TO)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)
Trimetropin sulf (B)	0(0%)	3(100%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)
Vancomicina (V)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)

9 ANEXOS

TABELA 12 – Índice de NMP e limites de confiança de 95% para estimar testes em tubos de fermentação pela inoculação de cinco tubos com 0,1g, 0,01g e 0,001g

n° de tubos positivos/5tubos			NMP/g	95% limites de confiança	
0,1g	0,01g	0,001g		Mínimo	Máximo
0	0	0	< 2	-	-
0	0	1	2	< 1	10
0	1	0	2	< 1	10
1	0	0	2	< 1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	25
2	2	0	9	3	25
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	30
3	1	1	14	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
3	3	0	17	7	41
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	68
5	0	1	31	13	110

n° de tubos positivos/5tubos			NMP/g	95% limites de confiança	
0,1g	0,01g	0,001g		Mínimo	Máximo
5	1	0	33	14	120
5	1	1	46	20	150
5	1	2	63	22	180
5	2	0	49	21	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	94	40	250
5	3	0	79	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	350	100	1300
5	5	2	540	220	2000
5	5	3	920	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	> 1600	-	-

FONTE: PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A & RAINOSEK, A.P. The Most Probable Number Technique. In: VANDERZAN, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. 3ª ed. American Public Health Association (APHA). Washington, 1992. 1219 p. Cap. 6, p. 114 – 115.

TABELA 13 – Número Mais Provável (NMP) para contagem normal pelo método SIMPLATE

Concavidades positivas = NMP	Concavidades positivas = NMP	Concavidades positivas = NMP
1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 195
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
Concavidades positivas	Concavidades positivas	Concavidades positivas
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 > 738

FONTE: TOWNSED, D.E.; IRVING, R.; SMITH, K., *et al.*, IDEXX Laboratories, INC.,
Westbrook, ME. USA., 1996