UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS TRADICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *PCR MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7

GLÁUCIA CELESTE DE SOUZA AMÂNCIO

2002

[redacted] [redacted] - [redacted]

GLÁUCIA CELESTE DE SOUZA AMÂNCIO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS TRADICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *PCR MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASI
2002

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Amâncio, Gláucia Celeste de Souza
Avaliação de métodos tradicionais e otimização da técnica de *PCR multiplex* para detecção de *Escherichia coli* O157:H7 / Gláucia Celeste de Souza Amâncio. -- Lavras : UFLA, 2002.
85 p. : il.

Orientadora: Maria Lúcia Pereira.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Metodologia tradicional. 3. Técnica de PCR multiplex. 4. Síndrome Hemolítica uremica. 5. Detecção. 6. Alimento de origem animal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163
-641.3

GLÁUCIA CELESTE DE SOUZA AMÂNCIO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS TRADICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *PCR MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Aprovada em

Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho **UFLA**

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle **UFLA**

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu **UFLA**

Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira
FUNED
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

À FUNED, Fundação Ezequiel Dias, por possibilitar a realização deste trabalho, disponibilizando diferentes recursos.

À UFLA e aos seus Professores pela oportunidade e aprendizagem.

À Professora Lúcia, a quem devo todos os ensinamentos científicos desde estagiária até o incentivo ao Mestrado, pela incessante orientação deste trabalho e por sua disponibilidade.

À Professora Eliana pelo apoio e confiança.

A Leila por sua amizade e paciência e, principalmente, por sua total dedicação e colaboração efetiva na parte de Biologia Molecular.

Aos Professores e Técnicos do CEDAF-UFV, Florestal, pela parceria, confiança e aceitabilidade do Projeto e, ainda, pelo respaldo técnico nas várias coletas.

Às pessoas responsáveis pela administração e aos funcionários da Indústria de Produtos Cárneos, localizada no município de Contagem, MG, pela receptividade e disponibilidade funcional durante as coletas.

À minha família que, mesmo de longe, sempre me apoiou nos estudos

Ao Francesco, meu amável companheiro e conselheiro, que compreendeu minha ausência e as tantas horas no Laboratório, nesse longo período

Às colegas e amigas especiais do Laboratório do SAEM, FUNED, pela ótima convivência, pela amizade que perdura e pela ajuda técnica durante essa caminhada: Ritinha, Maira, Elayne Cristina e Camila.

Aos colegas de Lavras pelas experiências e pela hospedagem que, por vezes, foi necessária.

A todos os funcionários dos Setores de Produção de Meio de Cultura e Lavagem e Esterilização de Materiais, FUNED, sempre prestativos nos auxílios necessários durante essa etapa.

Aos funcionários dos Setores de Microscopia de Alimentos, Química Especializada e Micotoxinas, FUNED, pelo empréstimo de equipamentos e, em especial, à Química Bromatológica, onde se realizaram as análises físico-químicas.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

Sem colaboração e apoio não é possível a realização de nenhum trabalho. Portanto, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO

AMÂNCIO, Gláucia Celeste de Souza. **Avaliação de Métodos Tradicionais e Otimização da Técnica de *PCR multiplex* para Detecção de *Escherichia coli* O157:H7** – Lavras: UFLA, 85p., 2002 (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).

Na década de 90, após ter sido esclarecida a participação de alimentos no processo de transmissão de *Escherichia coli* enterohemorrágica, mais especificamente *E.coli* O157:H7, estudos sobre o microrganismo vêm sendo amplamente realizados. No Brasil, até o presente momento, muito embora já evidenciada em fezes de gado bovino e suíno, não se dispõe de registro da contaminação natural deste patógeno em alimentos. Considerando-se a necessidade de um maior entendimento da ecologia do microrganismo e levando-se em conta as reais dificuldades observadas em sua detecção esta pesquisa foi levada a efeito. Adotaram-se assim, substratos de origem bovina, amostras fornecidas pelo CEDAF-UFV, Florestal, MG - leite *in natura* e carne assepticamente moída em laboratório - e amostras coletadas no comércio de Belo Horizonte, MG - leite pasteurizado tipo C e carne moída, que, em uma primeira etapa, foram avaliados sob o ponto de vista microbiológico. Paralelamente, realizou-se, de acordo com Ensaio Piloto, inoculação artificial destes substratos com cepa padrão de *E.coli* O157:H7 na concentração de 10^2UFC/g. Para tal, dois distintos Protocolos voltados à metodologia analítica tradicional, com uso ou não de pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada, APT, foram executados. Em uma segunda etapa, seguindo procedimento específico, fezes de fêmeas bovinas sadias e em fase de lactação foram pesquisadas quanto à contaminação natural do microrganismo. Em seguida, a terceira etapa consistiu, por sua vez, na aplicação do melhor Protocolo anteriormente revelado. Para tanto, leite *in natura* - daquelas fêmeas bovinas estudadas na primeira etapa e porventura positivadas com o microrganismo em suas fezes – e amostras de carne bovina moída destinadas ao preparo industrial de hambúrguer e fornecidas por uma Indústria de Produtos Cárneos localizada no município de Contagem, MG, foram pesquisadas. Finalmente, em uma quarta e última etapa, após otimização da técnica de *PCR multiplex*, Reação Múltipla de Polimerase em Cadeia, usando simultaneamente quatro pares de iniciadores específicos – VT_1, *eae*A, EHEC-*hly* e O157 - para distintas regiões genômicas da cepa padrão de *E.coli* O157:H7, esta foi aplicada ao estudo de todas as amostras alimentícias e material fecal envolvidos nas três etapas anteriormente descritas. Os resultados obtidos revelaram ausência de *E.coli* O157:H7 enquanto

contaminante natural dos substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados. Por intermédio deste Ensaio Piloto ficou demonstrada a eficiência dos métodos tradicionais e da técnica de *PCR multiplex* na recuperação e detecção do microrganismo artificialmente inoculado, muito embora todas as 60 amostras de alimentos e material fecal de origem bovina pesquisados tenham se mostrado negativas quanto à contaminação natural com o patógeno em questão. Chama-se a atenção para o elevado grau de sensibilidade, rapidez e especificidade da técnica de *PCR multiplex* neste experimento, otimizada com uma temperatura de anelamento de 56°C e com a concentração de 25pmol de cada iniciador molecular para a detecção da cepa padrão de *E.coli* O157:H7 então empregada neste experimento.

Comitê de Orientação: Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira – FUNED (Orientadora), Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Co-orientadora), Dra. Leila Saddi Ortega – FUNED (Colaboradora)

ABSTRACT

AMÂNCIO, Gláucia Celeste de Souza. **Evaluation of Traditional Methods and Optimization of Multiplex PCR Technique for Detection of *Escherichia coli* O157:H7** – Lavras: UFLA, 85p., 2002.

Since the 90's, after being proved the role of food in the transmittion process of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, specifically the *E. coli* O157:H7, there has been many research on this microorganism. In Brazil, although it has been found in livestock excreta, both from cattle and from hogs, there hasn't been, up to now, any register of natural contamination in food. Since it is difficult to detect its presence, there has been a real necessity to understand the ecology of this microorganism, and that is the aim of the present study. The analyzing data consisted of cattle substratum – raw milk and aseptically laboratory ground beef samples which were provided by CEDAF – UFV, in the city of Florestal, MG and samples picked out in regular stores in the city of Belo Horizonte, MG – pasteurized type C milk and ground beef. In the first phase of the research the samples under went a microbiological analysis. Meanwhile, according to the Pilot Study used, the entire substratum was artificially inoculated with a standard *E. coli* O157:H7 core in a concentration of 10^2 UFC/g. To do so, two distinct Protocols from the traditional analytic methodology with or without pre-enrichment in Buffered Peptone Water, BPW, were executed. The second phase consisted of a specific analysis to detect natural contamination from the microorganism in the excretions cows during the lactation period. The third one consisted in the usage of the best Protocol used so far. To do so, raw milk from the cows analyzed in the first phase which were positively tested with the microorganism in their excretions and ground beef aimed at the hamburger industry which was provided by an meat products industry located in the city of Contagem, MG were tested. Finally the fourth phase, which was done after the Polymerize Chain Multiple Reaction, multiplex PCR, there was simultaneously used four pairs of specific indicators – Vt_1, eaeA, EHEC- hly and O157 – to distinct genomic regions in the standard core of *E. coli* O157:H7. This technique was applied in all food samples and excreta matter used in the three previous phases. The results showed absence of *E. coli* O157:H7 as a natural contaminator from cattle food substratum artificially inoculated. Through this Pilot Study there has been proved the efficiency of the traditional methods as well as the multiplex PCR technique in restoring and detecting artificially inoculated microorganisms, even though all 60 cattle originated food samples and excreta matter had shown negative to

natural contamination through the photogene in focus. It is relevant to emphasize the high degree of sensibility, speed and specification of the multiplex PCR technique which was used in this experiment, optimized by an annealing temperature of 56°C in a concentration of 25pmol in each molecule initiator to detect the *E. coli* O157:H7 standard core.

Guidance Commitee: Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira – FUNED (Adviser), Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA, Dra. Leila Saddi Ortega – FUNED.

1 INTRODUÇÃO

A alteração dos hábitos alimentares, a introdução da cadeia de frios no mercado e a diversificação do acesso de produtos alimentícios a outras áreas geográficas têm contribuído de maneira significativa para o aumento da difusão de doenças de origem alimentar.

Tanto na América como em outros continentes, tal situação acabou por trazer à evidência bactérias atualmente designadas como emergentes, podendo-se destacar a *Escherichia coli* enterohemorrágica, EHEC, mais especificamente *E.coli* O157:H7.

Em 1975, nos Estados Unidos, *E.coli* enterohemorrágica foi pela primeira vez isolada a partir de material fecal de paciente hospitalizado. Somente na década de 80 pesquisas intensas foram realizadas e o microrganismo, desde então, passou a ser referenciado como agente causal de patologia que pode apresentar até três quadros clínicos distintos.

O primeiro quadro constitui o processo severo e súbito de colite hemorrágica, *HC*; o segundo, designado por Síndrome Hemolítica Urêmica, *HUS*, é caracterizado por forte acometimento renal e o terceiro e último, denominado Púrpura Trombocitopênico Trombótica, *TTP*, atinge com rigor o sistema nervoso central.

Estes três quadros clínicos, ora descritos de maneira sumária e cuja evolução está na dependência de vários fatores, entre eles, idade e resistência imunológica do paciente, pode atingir significativo índice de mortalidade.

O domínio da extensão desta patogenicidade e o reconhecimento de EHEC como responsável pela sua gênese só veio a ocorrer em meados dos anos 80, quando a bactéria foi associada a um surto ocorrido nos Estados de Oregon e Michigan, EUA.

Somente dez anos mais tarde, em 1992, após vultuoso episódio que envolveu 600 pessoas e resultou na morte de quatro crianças devido ao consumo de hambúrguer, tornou-se finalmente esclarecido que a transmissão de *E.coli* O157:H7 pode vir a ocorrer através da ingestão de água e alimentos contaminados.

Podem ser destacados produtos de origem animal, sobretudo aqueles de procedência bovina, em primazia, a carne moída para hambúrguer e o leite cru. Em menor escala podem ainda ser citados água para consumo e recreação; batata; brotos de alfafa e rabanete; hortaliças de folhas; maionese; salame; e ainda suco de maçã não pasteurizado.

No que tange à presença do microrganismo em animais, estudos já o revelaram em fezes de gado bovino, inclusive naquele cujo leite foi associado a casos de *HUS*, confirmando-se esses como reservatório da bactéria.

No Brasil, em 1985 e 1993, estudos demonstraram o isolamento desta enteral em fezes de suínos e bovinos, respectivamente. Contudo, até o presente momento, não existe sequer uma notificação da ocorrência de surto no país.

Somados a esta realidade, relatos da detecção natural desta bactéria inexistem para diferentes produtos alimentícios, o que se confirma igualmente em pesquisas fora do Brasil.

Mesmo considerando que a infecção ocasionada por *E.coli* O157:H7 tenha sido epidemiologicamente ligada, em sua grande maioria, ao consumo de carne bovina moída é de muito baixa freqüência, cerca de 2,17%, o isolamento do microrganismo neste produto cárneo.

As dificuldades observadas para a detecção e isolamento de *E.coli* O157:H7 – inclusive em estudos envolvendo inoculação artificial – têm levado pesquisadores a constantes inovações dos protocolos da metodologia analítica tradicional, observando-se, com freqüência, a recomendação de técnicas auxiliares ou que se complementam.

Buscando um maior entendimento da ecologia do microrganismo e o possível estabelecimento de seu papel em doenças transmitidas por alimentos, o presente projeto foi delineado em quatro etapas.

A primeira etapa ou Ensaio Piloto consistiu da avaliação de dois Protocolos da metodologia analítica tradicional, através dos quais, por intermédio de inoculação artificial, foram estudados os seguintes substratos de origem bovina: leite *in natura* e carne coletados no CEDAF-UFV, Florestal, MG, leite pasteurizado tipo C e carne coletados em Belo Horizonte, MG.

Em uma segunda etapa, amostras de material fecal de fêmeas bovinas, procedentes do CEDAF-UFV, foram avaliadas quanto à presença natural de *E.coli* O157:H7.

Na terceira etapa, leite *in natura* - daqueles animais positivados com *E.coli* O157:H7 em suas fezes na segunda etapa - e carne bovina moída para hambúrguer procedente de uma Indústria de Produtos Cárneos localizada em Contagem, MG, foram analisadas.

De maneira similar, amostras, tanto aquelas utilizadas na primeira como na segunda e terceira etapas, foram também pesquisadas por intermédio da técnica de *PCR multiplex*, técnica esta previamente otimizada para os fins deste experimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Algumas considerações sobre *E.coli* e a família Enterobacteriaceae - taxonomia, habitat, comportamento bioquímico e patogenicidade

Escherichia coli, atualmente catalogada como pertencente ao Grupo 5, subgrupo 1, caracteriza o 9º gênero da família Enterobacteriaceae (Holt et al., 1994), tendo sido descrita pela primeira vez pelo pesquisador Teodor Escherich, em 1885.

Trata-se de bactéria predominante na microbiota intestinal do homem e demais animais de sangue quente e que, em função disso, dada a especificidade de seu nicho e tempo de sobrevida exclusivo no trato intestinal, vem sendo utilizada como microrganismo indicador em estudos de contaminação fecal em água, desde 1892, e em alimentos (ICMSF, 1983).

Como indicador higiênico-sanitário, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia* e *Citrobacter*, *E.coli* está apta a informar sobre as condições microbiológicas dos alimentos, abrangendo desde a matéria-prima, fases de processamento e produto acabado, bem como é também capaz de indicar nestes a possível presença de patógenos (ICMSF, 1983).

A família Enterobacteriaceae é constituída por bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, móveis ou imóveis e anaeróbios facultativos. Fermentam glicose e outros carboidratos, produzindo ácido pirúvico, que é convertido em ácido lático, acético ou fórmico, para produção de CO_2 e H_2. A lactose é fermentada pela maioria das cepas. Reduzem nitrato a nitrito e são oxidase negativos. Produzem usualmente o indol; apresentam reação negativa para acetil-metil-carbinol e positiva para vermelho de metila; não utilizam o citrato como única fonte de carbono. São produtores de catalase e lipase;

hidrolisam a uréia; não possuem habilidade de converter o H_2S (Holt et al., 1994).

Distribuem-se a partir das fezes, habitat específico e,ou, primário, e através do solo, sendo veiculados pela água até vegetais, frutas e hortaliças.

Constituindo *E.coli* a espécie predominante entre os anaeróbios facultativos da microbiota intestinal, desempenha importante papel na manutenção fisiológica deste órgão.

Entretanto, existe expressivo número de cepas patogênicas que causam distintas síndromes diarréicas, as quais integram as principais categorias e contemplam diferentes fatores de virulência; diversas interações com a mucosa intestinal; sintomatologia e epidemiologia distintas, e, finalmente, variadas respostas antigênicas (Levine, 1987). As principais categorias, incluem *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC ou VTEC), *E.coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E.coli* necrosante (NTEC), de acordo com Levine (1987) e Giugliano et al. (1995a, b).

2.2 *E.coli* enterohemorrágica (EHEC)

2.2.1 Comportamento bioquímico e sorológico

Este microrganismo apresenta características bioquímicas específicas que o personalizam, distinguindo-o, para efeito de pesquisa, tanto em material clínico como a partir de alimentos, de outras *E. coli* . Isto pode ser representado por sua incapacidade de utilizar o sorbitol e ramnose dentro de um período mínimo de 24 horas e de hidrolisar o substrato 4-metil-umbeliferil-β-D-glucuronídeo (MUG), responsável pela produção de fluorescência na presença de luz ultravioleta a 366 nm, uma vez não possuidora da enzima constitutiva β-D-glucuronidase. É capaz de descarboxilar a lisina e ornitina e ainda de fermentar a rafinose e o dulcitol (Chapman,1995a; Doyle & Schoeni, 1987).

No que concerne ao comportamento sorológico, *E.coli* enterohemorrágica, a exemplo de outras enterais, é identificada através de antissoros preparados contra as duas variedades de antígenos que podem estar presentes: O, antígeno somático, e H, antígeno flagelar. Desta maneira, até o presente momento, EHEC apresenta 38 sorovars catalogados, sendo O26:H11 e O157:H7 aqueles mais citados, sobretudo este último, agente etiológico da grande maioria de surtos (O'Brien et al., 1983; Samadpour et al., 1994; Heuvelink et al., 1997).

2.2.2 Condições de crescimento

E.coli O157:H7 desenvolve-se rapidamente em faixa de temperatura situada entre 30 a 42 °C, mas distintamente de outras *E.coli*, é difícil ou impossível seu isolamento à temperatura 44-45,5 °C, aquela oficialmente recomendada para a pesquisa de coliformes fecais em água e alimentos (Doyle & Schoeni, 1987), embora estudos realizados por Palumbo et al. (1995) tenham evidenciado o crescimento e produção de toxinas por algumas linhagens, em temperaturas que variavam de 10 a 49° C.

Segundo Doyle & Schoeni (1987), através de estudos experimentais em carne moída, foi verificado que este microrganismo, é mais sensível ao calor que *Salmonella*, apresentando valor D de 57,2; 60,0; 62,8 e 64,3 °C em 70, 45, 24 e 9,6 segundos, respectivamente. Porém, sobrevive bem em temperaturas de congelamento, o que se constatou em hambúrgueres estocados a -20 °C, durante 9 meses, não se observando redução significativa em sua contagem.

De acordo com pesquisas, *E.coli* O157:H7 apresenta habilidade para se desenvolver em baixas condições de pH, em torno de 3,4, o que a diferencia de outros patógenos (Doyle, 1989).

2.3 Aspectos epidemiológicos

2.3.1 Dose mínima infectante

A dose infectiva necessária para provocar os sintomas permanece obscura, mas, de acordo com dados catalogados em diferentes episódios, esta se encontra situada na faixa de 10 a 10^3 células/g ou mL do alimento consumido (CDC, 1993; Lior, 1994).

2.3.2 Mecanismo de patogenicidade, fatores de virulência e sua codificação genética

Até o presente momento, o que igualmente ocorre para outras *E.coli* patogênicas, EHEC não teve seu mecanismo de patogenicidade totalmente elucidado. Sabe-se, todavia, que este deve se encontrar vinculado a dois fatores: capacidade de aderência às células do hospedeiro e habilidade de produzir toxinas, que se responsabilizam pela implantação da infecção propriamente dita (Doyle & Schoeni, 1987).

EHEC ou VTEC tem sido relatada por apresentar fatores de virulência associados à produção de citotoxinas denominadas, inicialmente de verocitotoxinas - Vt_1, Vt_2 e Vt_3 - por produzirem efeito citopático *in vitro*, em células de linhagem Vero, e posteriormente de *Shiga-like toxins* - Stx_1, Stx_2 e Stx_3, nova designação proposta por O'Brien et al.(1983).

Em pesquisa conduzida por estes últimos autores, foi constatada a possibilidade de neutralização de sobrenadantes de culturas de *E.coli* O157:H7 com soros produzidos contra a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo I, revelando, de acordo com ensaios de imunodifusão de Ouchterlony, similaridade tanto no comportamento imunológico como de estrutura química e, desta forma, afiançando o caráter de indistinguibilidade destas.

A Stx_1 foi purificada por Noda et al. (1985) (apud Doyle, 1989), tratando-se de proteína constituída por uma subunidade A, de peso molecular situado entre 29 a 31 KDa, e outra subunidade B, com peso molecular entre

5 a 6 KDa, esta última responsável pela aderência da toxina a receptores glicolipídicos específicos, denominados globotriaosilceramideo, GB_3 - presentes na superfície de células eucariotas, sendo encontrados em altas concentrações em células renais, intestinais e do sistema nervoso central (Nataro & Kaper, 1998).

Por sua vez, a purificação de Stx_2 realizada por Padhye et al.(1994) revelou ser esta também constituída por duas subunidades de mesmo peso molecular, diferenciando-se da Stx_1 apenas em decorrência da incapacidade de sua neutralização com antissoro contra a Shiga toxina.

Entretanto, distintamente, a estrutura molecular de Stx_2 pode apresentar variantes na subunidade B, o que permitiu novas designações, dentre elas *Stx2c*, *Stx2v* e *Stx2e*, além do fato de esta última variante ligar-se a outro receptor diferente do GB.

Cepas de *E.coli* O157:H7 podem apresentar apenas Stx_1, Stx_2 ou ambas e, ao que parece, segundo estudos realizados em culturas de tecido renal, a Stx_2 é mais potente no que diz respeito à indução de citotoxicidade.

Apesar de serem mais comuns linhagens produtoras de Stx_1 e Stx_2, uma terceira toxina - Stx_3 - foi também purificada (Padhye et al., 1994). Esta Stx_3, à semelhança de Stx_2, não se neutraliza com antissoro contra a Shiga toxina e, ao contrário da Stx_1 que está associada à célula, está presente principalmente em filtrados de cultura.

Os efeitos dessas toxinas em tecido renal humano, de acordo com estudos realizados *in vitro*, caracterizam intumescimento das células glomerulares devido à deposição de plaquetas e fibrinas, sugerindo causar o estreitamento da lâmina capilar com ocasionamento da diminuição do filtrado glomerular, responsável, presumidamente, pela falência renal aguda típica da *HUS* (Nataro & Kaper, 1998).

Outra característica de patogenicidade, possivelmente associada às fímbrias, consiste da capacidade de adesão às células intestinais. Este processo é codificado pelo plasmídeo 60-MDa, que *in vitro* foi responsabilizado pela adesão a células intestinais He-La (Karch et al., 1996). Após a adesão, segue-se a formação de lesões do tipo *attaching and effacing* - lesão *AE* - sobre a lâmina própria das microvilosidades intestinais, com conseqüentes alterações no citoesqueleto celular. Ainda no citoesqueleto, ocorre o acúmulo de filamentos de actina e a formação de uma estrutura em forma de pedestal, o que gera desequilíbrio na absorção e secreção de fluidos (McDaniel et al.,1995).

Além disso, cepas de *E.coli* produtoras de Shiga-toxinas apresentam hemolisina, a qual, em se tratando do sorogrupo O157, está associada ao mesmo plasmídeo 60-MDa, estando vinculada à patogênese da síndrome hemolítica urêmica, *HUS*, embora esta correlação não se encontre inteiramente confirmada (Nataro & Kaper, 1998).

2.3.3 Transmissão: papel dos alimentos e reservatório animal

E.coli enterohemorrágica foi, em 1975, nos Estados Unidos, pela primeira vez isolada a partir de fezes de paciente que apresentava quadro clínico com diarréia sangüinolenta (Su & Brant, 1995).

Seu reconhecimento como patógeno de origem alimentar ocorreu, contudo, no início dos anos 80, quando foi associada a um surto ocorrido nos estados de Oregon e Michigan, EUA.

Porém, somente dez anos mais tarde, sua importância foi assomada, após um surto que envolveu 600 pessoas e ocasionou a morte de quatro crianças, igualmente devido ao consumo de hambúrguer, em uma rede de *fast-food* (Bell et al., 1994).

Dessa maneira, tornou-se evidente que a transmissão de EHEC ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, por excelência a carne bovina

moída, embora existam outros relatos que aventam a possibilidade de a transmissão ocorrer por intermédio do contato pessoa-a-pessoa, em ambientes circunscritos, como em instituições ou em residências, ou ainda pelo contato direto do manipulador de alimentos com animal infectado ou suas fezes (Nataro & Kaper, 1998; Chapman, 1995a).

Apesar da evidência de surtos e casos de *HC* e *HUS* a transmissão por *E.coli* O157:H7 estivesse epidemiologicamente ligada ao consumo, sobretudo de carne bovina moída, observa-se freqüência muito baixa, cerca de 2,17% de seu isolamento, conforme pesquisas aleatórias que buscam o microrganismo em substrato cárneo (Doyle, 1989).

De qualquer modo, é reconhecida a importância maior dos alimentos de origem animal, sobremaneira aqueles de procedência bovina, destacando-se carne moída para hambúrguer, carne pré-cozida, rosbife, leite cru e iogurte; além de outras carnes de diferentes origens, como carneiro, porco e aves.

Outros alimentos, embora em menor escala, já foram relatados como de importância na transmissão da doença como é o caso de água para consumo e recreação; batata; brotos de alfafa e rabanete; hortaliças; maionese; salame e suco de maçã não-pasteurizado (Morgan et al., 1988; Swerdlow et al., 1992; Weagant et al., 1994; CDC, 1995; Ackers et al., 1996).

No que tange à presença do microrganismo em animais, estudos já revelaram a presença de *E.coli* O157:H7 em fezes de gado bovino com uma a três semanas de idade. Foi também identificado em gado bovino cujo leite foi associado a casos de *HUS*, confirmando-se, assim, esse animal como seu reservatório.

Quanto às aves, de acordo com o reportado por Beery et al. (1985, apud Doyle, 1989), foi observada a colonização do ceco de frangos com conseqüente eliminação do microrganismo através de suas fezes, o que se constatou no

decorrer de vários meses, embora não existam relatos da presença de EHEC em seus subprodutos (Smith et al., 1991).

Já para suínos e ovinos, embora com presença confirmada, cepas de *E.coli* O157 isoladas a partir de fezes dos animais em questão não se apresentaram com as mesmas características de patogenicidade daquelas isoladas em seus derivados e a partir de pacientes humanos com *HC* e,ou, *HUS* (Lingood & Thompson, 1987; Gannon et al., 1988; Doyle, 1989).

Na América Latina, principalmente Argentina, Venezuela e Brasil, tem-se buscado, através de análises experimentais, a caracterização de vínculo epidemiológico entre homem, gado e alimentos, bem como metodologias por meio das quais se obtenham melhores resultados para recuperação e isolamento do microrganismo em questão.

No Brasil, o primeiro estudo voltado ao isolamento de *E.coli* enterohemorrágica ocorreu em 1985, a partir de amostras fecais de suínos, realizado por Gatti et al (1985). Posteriormente, em 1993, conforme relatos de Barreiros et al., outra detecção foi levada a efeito, desta vez em fezes de gado bovino.

Segundo Cerqueira et al. (1998), estudos com fins epidemiológicos foram conduzidos utilizando carne moída e fezes de origem bovina e humana.

No que diz respeito a alimentos, ainda no Brasil, pesquisas confirmaram a possibilidade de crescimento e sobrevivência de EHEC em diferentes condições de cultivo, tanto em carne bovina como em leite cru, porém estas pesquisas foram moduladas de acordo com critérios baseados em inoculação experimental para avaliação de metodologias analíticas (Marques, 1997; Manahani & Serrano, 1998; Marques & Landgraf, 1998; Franco & Landgraf, 1999; Manhani, 2000).

Por outro lado, estudos efetuados em amostras de queijo tipo Minas mantido em condições de baixa temperatura não demonstraram, ao longo de 16

meses, resposta positiva de forma a se confirmar contaminação natural por *E.coli* O157:H7 (Pereira et al., 1999); assim como amostras de produtos cárneos de ambiente industrial ou adquiridas no mercado (Marques, 1997; Silva et al.,1998; Viegas & Bechtel, 1999).

2.3.4 A doença, seus sintomas e perfil dos acometidos

A doença transmitida por *E.coli O*157:H7 é caracterizada por até três processos distintos. O primeiro é constituído por um quadro severo e súbito de colite hemorrágica, comumente designada como *HC*. Esta colite, segundo Pai et al. (1984) e Riley et al. (1983), se expressa por cãimbras e dores abdominais intensas - mais fortes que as dores de apendicite – e tão intensas que podem ser equiparadas àquelas vivenciadas por ocasião do parto. Esta colite hemorrágica, é acompanhada, no decorrer de 24 horas, por diarréia aquosa, que posteriormente se transforma em enorme sangramento, em que não mais se evidencia qualquer sinal de fezes.

Sintomas eméticos podem ocorrer e não se observa ou ocorre raramente estado febril. O período de incubação ocorre entre três e quatro dias e o tempo de duração desta colite é de dois a nove dias (Riley et al., 1983; Pudden, 1985 apud Doyle, 1989).

A *HC* acomete pessoas de qualquer faixa etária. Em se tratando de indivíduos sadios, esses se recuperam no período de quatro a dez dias, o que não se constata para idosos, crianças menores de cinco anos, indivíduos imunodeprimidos, como aidéticos, deficientes e transplantados renais (Weagant et al., 1994).

Em pacientes enquadrados como pertencentes ao grupo de risco - cerca de 10% menores de dez anos - ao redor do sétimo dia do aparecimento dos primeiros sintomas, circunscritos à *HC*, estes podem vir a evoluir para um

grave acometimento renal, denominado Síndrome Hemolítica Urêmica, *HUS*, que personaliza o segundo estágio da infecção por *E.coli O*157:H7.

Esta síndrome apresenta, em casos típicos, anemia hemolítica microangiopática, que se manifesta por meio da coagulação intravascular dos eritrócitos provocando danos mecânicos pela compressão gerada pelo estreitamento anormal da cadeia; trombocitopenia e nefropatia aguda, a qual se manifesta por completa desordem renal.

Os acometidos experimentam significativa morbidade, tornando-se necessária a terapêutica de hemodiálise; podem vir a apresentar danos no sistema nervoso central, com desmaios ou acessos que levam à coma e até à morte (Doyle, 1989).

Segundo Nataro & Kaper (1998), alguns pacientes aparentemente recuperados desta síndrome, uma vez estabilizados os sintomas clínicos da infecção, podem, por vários anos, desenvolver anormalidades da função renal, como proteinúria, hipertensão, redução na filtração glomerular e na concentração de urina, embora pouco se saiba sobre a freqüência real de infecções subclínicas provocadas pelo sorotipo O157:H7 no homem.

Já a Púrpura Trombocitopênico Trombótica, *TTP*, terceira e última possibilidade decorrente da infecção, manifesta-se por falhas patológicas e clínicas semelhantes ao quadro anteriormente descrito, porém nesta o processo se vê representado pelo acometimento do sistema nervoso central e também por estado febril.

Apesar de a diarréia não ser comumente relatada antes do início da *TTP*, dores abdominais acompanhadas por severa hemorragia gastrintestinal ocorrem. Os pacientes desenvolvem, com freqüência, coágulos de sangue no cérebro, ocasionando o óbito na maioria das vezes (Ramsey & Neill, 1986 apud Doyle, 1989).

Segundo Grandensen et al. e Spika et al. (1986 apud Doyle, 1989) diarréia não sangüinolenta, cistite hemorrágica e balanites também já foram atribuídas a *E.coli* O157:H7 (Doyle, 1989).

2.3.4.1 Sazonalidade

Na América do Norte, as infecções por EHEC têm distribuição sazonal, ocorrendo entre o verão e o outono, época em que é comum o consumo de churrasco, aumentando, desta maneira, a ingestão de carne mal passada. Já no Reino Unido, a sazonalidade parece ocorrer mais cedo, entre a primavera e o verão, ressaltando não apenas a carne como fonte de infecção, mas também frutos e vegetais (Chapman, 1995a, b).

2.3.5 Relatos de surtos

Do início dos anos 80, quando EHEC foi associada pela primeira vez a um surto ocorrido nos Estados de Oregon e Michigan, EUA, passou a ser reconhecido como microrganismo emergente de enfermidades transmissíveis por alimentos em todo mundo.

Os dados elencados na Tabela 1 evidenciam a realidade de casos isolados e surtos, alguns com episódios de maior porte, relacionando-se, no decorrer de 18 anos, ou seja, no período situado entre 1982 e, possivelmente, 2001, local de ocorrência, número de acometidos e alimentos envolvidos.

2.3.6 Medidas de controle

De acordo com Meng et al.(1994), Wuetrich (1994), USDA (1994) e Chapman (1995a,b), tendo em vista a possibilidade da contaminação através de fezes, é importante a redução, sobretudo de portadores animais, que carreiam *E.coli* O157:H7.

TABELA 1 Episódios, com ocorrência situada entre 1982 a 2001, envolvendo *E.coli* O157:H7

Local	Ano	Acometidos (nº e perfil)	Obitos (nº)	Substrato envolvido	Referências de autores
Michigan e Oregon	1982	47 adultos	–	Hambúrguer	Padye & Doyle (1994)
Toronto	1982	31 idosos	–	Hambúrguer	Karmali (1989)
Ontário	1985	73 adultos e idosos	17	Sanduíche de peru, presunto e queijo	Carter et al. (1987)
Walla-Walla	1986	89 pessoas	02	Carne moída	FDA (1999)
Europa	1987-1991	–	13	Hambúrguer e leite não-pasteurizado	Waters et al. (1994)
Escócia	1990	16 pessoas	–	–	Waters et al. (1994)
Reino Unido	1991	16 adultos e crianças	–	Iogurte	Morgan at al. (1993)
Escócia e País de Gales	1992-1996	381 pessoas	14	Carne cozida resfriada, vegetais crus, pratos à base de carne moída	Adak et al. (1997)
Estados Unidos	1992	600 adultos e crianças	04 crianças	–	Bell et al. (1994)
Estados Unidos	1993	300 pessoas	–	Maionese	Weagant et al. (1994)
Estados Unidos	1993	>500 pessoas	05	–	Tarr (1993)
Estados Unidos	1993	3 pessoas	–	Hambúrguer	CDC (1994)
Washington	1994	23 adultos	–	Salame fatiado	Hinkens et al. (1996)

"...continua..."

"TABELA 1, Cont."

Nova Jersey	1994	46 adultos	_	Hambúrguer	CDC (1995)
Escócia	1994	>100 pessoas	_	Leite	Sharp (1998)
Escócia	1995	292 pessoas	18	Torta de carne	Ahmed & Conner (1995)
Canadá e Estados Unidos	1996	45 adultos	01	Suco de maçã	Glynn et al. (1997)
Japão	1996	9578 pessoas	11	Hambúrguer, saladas, "sushi", sopa, bifes, fígado, intestino de bovinos	Bettelheim (1997), Fukushima et al. (1997)
Escócia	1997	410 pessoas	18	Produtos cárneos	Reilly & Carter (1997)
Rep. Camarões	1998	237 pessoas	44	Carne defumada	Germani et al. (1998)
New York	1999	116 pessoas	02	Água de recreação	CDC (2000)
Dakota do Norte	_	70 pessoas	_	Carne assada	CDC (1993)
Missouri	_	>240 pessoas	04	Água	Swerdlow et al. (1992)
África do Sul	_	_	_	Água	Isaacson et al. (1993)
Estados Unidos	_	_	01	Vegetais	Cieslak et al. (1993)
Geórgia e Tennesse	_	08 pessoas	_	Hambúrguer	CDC (1996)
Estados Unidos	_	_	_	Brotos de alface	Mermin et al. (1997)
Escócia	_	100 pessoas	_	Leite	Reilly & Carter (1997)
Escócia	_	410 pessoas	18	Produtos cárneos	Reilly & Carter (1997)
Inglaterra	_	03 pessoas	_	Leite não-pasteurizado	CDC (1991)
_	_	243 pessoas	04	Água	Rice (1993)

Não informado: -

Assim, medidas de controle que envolvam todas as etapas ao longo do processamento de produtos de origem animal poderiam ser alcançadas através das recomendações que ora se delineam:

- Seleção do gado leiteiro e de corte, enquanto matéria-prima ou fornecedor desta; higienização do rebanho e controle de abate, de forma a se evitar a contaminação cruzada decorrente do contato de vísceras e conteúdo gastrointestinal dos animais com seus subprodutos.
- Inspeção das etapas de processamento dos produtos derivados, através da implantação de Programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, APPCC, de forma a diminuir os riscos de contaminação por *E.coli* O157:H7, além de outros patógenos.
- Desenvolvimento e atualização de novas tecnologias para eliminação dessa bactéria em especial e para preservação de seus subprodutos de maneira geral.
- Introdução de normas de Boas Práticas de Fabricação, BPF, tanto para funcionários de frigoríficos, indústrias de produtos cárneos e laticínios como para consumidores que utilizam estes alimentos.

Com base nos itens anteriormente transcritos, e conforme proposições reportadas por Thayer & Boyd (1993), Meng et al. (1994), Chapman (1995a, b) e Entani et al. (1997), algumas regras práticas podem ser adotadas de forma a evitar ou eliminar a contaminação de alimentos de origem animal por *E.coli* O157:H7, muito embora, dada a situação emergencial do microrganismo, muitas destas ainda se encontrem em fase de estudo:

- Para o controle da etapa de criação do gado, propõe-se o uso de microrganismos saprófitas, que normalmente colonizam os animais; ainda para competir com esta mesma flora patogênica, pode ser adotada a administração de vacinas utilizando genes de *E.coli* O157:H7 que codificam a produção de seus fatores de colonização.

- Antes do abate, poderia ser recomendada a adoção de pesquisa de EHEC, através de métodos rápidos, de maneira a se proceder a segregação dos animais contaminados, prevenindo-se, assim, a entrada deste patógeno na linha de produção.

- Para a descontaminação das carcaças já se utilizam outros ácidos orgânicos do tipo *GRAS*, *Generally Recognized As Safety*, uma vez que *E.coli* O157:H7 - distintamente de outros patógenos enterais - é altamente resistente aos ácidos acético, lático e cítrico, normalmente recomendados para esse fim; sem deixar de considerar que os primeiros ácidos para desinfecção de carcaças têm uso limitado, uma vez que são eficazes na redução da contaminação de tecido gorduroso, mas pouco efetivos quando aplicados em regiões de músculo magro.

- Utilização de testes rápidos para detecção de EHEC em produtos em fase de processamento e em superfícies de equipamentos.

- No produto acabado ou na última etapa do processamento, tratamentos químicos e físicos que inibam ou eliminam *E.coli* O157:H7 encontram-se em fase de proposição. Isto foi constatado uma vez que a atividade bacteriostática e bactericida de vários ácidos orgânicos, como o ácido acético, que constitui diferentes tipos de vinagre, como aqueles de álcool, cereais e arroz, apresentam, respectivamente, eficácia decrescente, não importando a concentração de inóculo, sendo mais eficazes na fase logarítmica de crescimento e em temperaturas próximas a 40 e 50 °C.

- Tratamento químico da carne com fosfato trissódico, *TSP*, na última etapa do processamento.

- Irradiação gama, utilizando cobalto 60, em doses de 1,5 a 3,0 KGy, tem apresentado ótimos resultados na eliminação de *E.coli* O157:H7 em carne moída e em carne de frango desossada mecanicamente.

- Para carnes assadas e produtos de carne moída prontos para o consumo, tem sido recomendado cozimento de forma que a temperatura interna atinja, respectivamente, 54 e 68 °C, no mínimo
- Todo o leite a ser consumido deve ser previamente pasteurizado, assim como outros produtos lácteos, bem como sucos de frutas.

2.4 Detecção e identificação de EHEC através de métodos tradicionais

Os métodos tradicionais usualmente empregados para a confirmação de presença de *E.coli* em água e alimentos não têm sido eficientes para recuperação de EHEC. Isto se deve ao fato de que o patógeno em questão não se desenvolve à temperatura de 44,5 °C, uma vez que tem seu ótimo de crescimento situado entre 30-42° C, não deixando de lado outras características específicas de seu comportamento (Doyle & Schoeni,1987).

Desta forma, tendo em vista a otimização de metodologia apropriada para a EHEC, métodos de enriquecimento e isolamento seletivo estão em estudo e vêm sendo sugeridos para a recuperação dessa bactéria.

2.4.1 Métodos de enriquecimento

Para a detecção de EHEC em alimentos, vários métodos já foram propostos. A maioria destes, contudo, lança mão da adição de antibióticos que inibem ou eliminam a microbiota acompanhante. O primeiro meio, *mTSB*+n, foi formulado por Doyle & Schoeni (1987), que modificaram o *Tripticase Soy Broth, TSB* acrescendo sais biliares nº 3, fosfato dipotássico e novobiocina, esta última na concentração de 20 mg/L .

Em 1989, Chapman et al. propuseram a utilização de *BPW*-vcc. Este meio foi formulado a partir de água peptonada tamponada, *BPW*, a 1%, após adição dos antibióticos vancomicina, 8 mg/L, cefixime, 0,05 mg/L e cefsulodina, 10 mg/L. Já o meio *mEC*+n foi proposto por Okrend et al. (1990a),

tendo sido desenvolvido através da inclusão de novobiocina, 20 mg/L, e sais biliares ao tradicional meio *EC*.

Outros dois meios de enriquecimento seletivo foram desenvolvidos por Kim & Doyle (1992) e Doyle & Schoeni (1987), respectivamente. Nesses caldos, designados pelas siglas *mTSB*+a e *mTSB*+a+n, foi empregado o mesmo caldo *mTSB*, sofrendo este a inclusão do antimicrobiano acriflavina-HCl complementado com casaminoácido para o primeiro e do antimicrobiano novobiocina para o segundo.

A formulação apresentada por Weagant et al.(1995) resultou no *EEB, EHEC Enrichment Broth*, tendo este como base o meio *mTSB*, de Doyle & Schoeni (1987), sofrendo, todavia, a exclusão da novobiocina e o acréscimo de vancomicina, cefixime e cefsulodina, seguindo idêntica recomendação de Chapman et al. (1989).

2.4.2 Meios sólidos seletivos de isolamento

Diversos meios para isolamento seletivo de EHEC O157:H7 estão sendo estudados. Esses meios, à semelhança daqueles relatados para a etapa de enriquecimento, contêm em sua formulação antimicrobianos que inibem a microbiota comumente presente, além de outros compostos que permitem evidenciar características inerentes a *E.coli* O157:H7, como, por exemplo, a não fermentação de sorbitol e a não utilização de telurito e ramnose.

A Tabela 2 relaciona alguns dos meios mais recomendados, de acordo com pesquisas realizadas por diferentes autores.

2.4.3 Identificação

2.4.3.1 Ensaios bioquímicos

A maioria das reações bioquímicas de *E.coli* O157:H7, com poucas exceções, são típicas da espécie *E.coli*, conforme pode ser observado nos itens

TABELA 2 Principais meios sólidos seletivos para isolamento de *E.coli* O157:H7

Meios seletivos diferenciais	Autores
Agar MacConkey sorbitol, *SMAC*	Wells et al. (1983)
Agar Colite Hemorrágica + 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo, *HC*-MUG	Szabo et al. (1986)
Agar MacConkey sorbitol + 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo, *SMAC*-MUG	March & Ratnam (1986)
Agar Vermelho de Fenol base + sorbitol + 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo, *PRS*-MUG	Levine (1987)
Agar Fluorocult Lauril Sulfato, FLS	Moberg et al. (1988)
Agar MacConkey sorbitol + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glucoronídeo, *SMAC*-BCIG	Okrend et al. (1990b)
Agar MacConkey sorbitol + cefixima + ramnose, *SMAC*-CR	Chapman et al. (1991)
Agar MacConkey sorbitol + cefixima + telurito de potássio, *SMAC*-CT	Zadik et al. (1993)
Ágar Sangue acrescido de cálcio	Bettelheim (1997)
Agar Rainbow ™ O157	Marques (1997)

2.1. e 2.2.1 anteriormente descritos, em que estas reações encontram-se criteriosamente elencadas.

Tendo em vista, entre outros, fatores a redução de demanda de tempo, o Sistema API-20E comercializado pela bioMérieux, Craponne, France, caracteriza a miniaturização do conjunto de provas bioquímicas empregadas para *E.coli*, embora ainda seja necessário sua complementação com outros

testes mais particularizados, no que diz respeito ao reconhecimento de *E.coli* O157:H7 (Doyle,1989).

A maioria dos procedimentos oficiais recomendam para a confirmação definitiva de *E.coli* O157:H7, além daqueles testes usualmente empregados para *E.coli*, fermentação dos açúcares sorbitol e celobiose e descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina (Silva et al.,1997; AOAC,1998).

2.4.3.2 Ensaios sorológicos

E.coli enterohemorrágica pode ser antigenicamente distinguida em sorogrupo/sorovars, através da soroaglutinação em lâmina utilizando antissoros de fatores somáticos O e antissoros flagelares H (Ewing, 1986).

Encontram-se comercialmente disponíveis pela Difco Laboratories, Detroit, USA, os antissoros somáticos monoclonais O157; policlonais O26, O55, O111, O114, O119, O125, O126, O128 e flagelares H2, H7, H11, H21, H27 e H34.

No que tange ao procedimento de detecção dos antígenos flagelares, recomenda-se a ativação de motilidade celular, através de cultivo sucessivo. Conforme recomendado por Cragie (Hofer[1], 2000), as linhagens suspeitas são inoculadas internamente em um dispositivo tubular, previamente aplicado no interior do ágar nutriente semi-sólido. As linhagens assim inoculadas são incubadas a 37 °C por 24 h e à temperatura ambiente por mais 24h. Decorrido este tempo, se o crescimento bacteriano atingir a parte externa do dispositivo de vidro, o mesmo procedimento deve ser repetido até que este atinja novamente a

---

[1] Hofer, Ernesto (Comunicação pessoal)
Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia,
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Caixa Postal 926, CEP: 21045-900
Rio de Janeiro RJ

parte externa em apenas 24 h. Nesta condição, ideal de crescimento, as linhagens poderão então ser submetidas à análise sorológica flagelar.

2.5 Outros métodos de detecção e identificação de EHEC

De acordo com o reportado por Heuvelink et al. (1997) e Doyle (1989), procedimentos dirigidos à busca de *E.coli* O157:H7 em diferentes alimentos apresentam-se de maneira geral pouco eficazes, levando, muitas vezes, a resultados insatisfatórios ou negativos. Esse fato tem conduzido a constantes inovações da metodologia analítica, em que pode ser observada, com freqüência, a recomendação de técnicas auxiliares ou que se complementam, além de terem em vista redução de tempo de análise, embora os custos destas sejam mais elevados. Os ensaios, abaixo transcritos e devidamente fundamentados exemplificam tal realidade.

2.5.1 Técnicas de filtração

2.5.1.1 *Hydrophobic grid membrane filter, ISO-GRID*

Método recomendado pela AOAC, edição de 1998. É utilizado para enumeração presuntiva de *E.coli* O157:H7 em diferentes substratos alimentícios como carne, aves, produtos lácteos, alimentos para recém-nascidos, ovos líquidos, maionese e cidra de maçã.

Encontra-se disponível pela QA Life Sciences, Inc., San Diego, USA, e, de maneira bastante simples, se fundamenta no emprego de uma membrana que apresenta características hidrofóbicas. Constitui uma rede, cujas linhas atuam como barreiras, em que as colônias microbianas são espalhadas até formação de compartimentos iguais e de dimensão conhecida. Após incubação, o número de compartimentos ocupados é convertido em valores de Número Mais Provável, NMP, de microrganismos.

É utilizado, para esta técnica, o ágar SD-39, o qual contém agentes seletivos voltados á inibição de bactérias Gram positivas e outras Gram

negativas. Aplicação diferencial de temperatura pode também ser utilizada. Ensaios bioquímicos e sorológicos são recomendados.

2.5.1.2 *Direct epifluorescent filter technique, DEFT*

Método em desenvolvimento para enumeração de *E.coli* O157:H7 em leite e sucos. Realiza-se em aproximadamente uma hora e apresenta sensibilidade de 10^3 UFC/mL. A bactéria é tratada com anticorpo policlonal fluorescente, comercialmente disponível pela Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA, seguindo-se de passagem em filtro de 0,22 μm e exame em microscópio epifluorescente. Necessita de confirmação bioquímica e sorológica.

2.5.2 Técnicas imunológicas

2.5.2.1 *E.* coli O157 *Latex Test*

Este kit utilizado como teste presuntivo é comercializado pela OXOID, Basingstoke, UK, o qual se baseia na aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos policlonais específicos para o antígeno somático O157. Recomenda-se para a utilização deste teste, o plaqueamento prévio em ágar *SMAC*, tendo em vista colônias não fermentadoras de sorbitol. Bons resultados já foram alcançados com amostras clínicas e substratos alimentícios (Heuvelink et al., 1997; Meng et al., 1994; March & Ratnam, 1986).

A desvantagem apresentada por essa técnica, como eventualmente é relatado para ensaios de imunoaglutinação dirigidos a outros microrganismos ou toxinas bacterianas, reside na ocorrência de reações inespecíficas ou cruzadas, para estas últimas resultando em positividade para *E.hermani*, *Brucella abortus*,

B.melitensis, *Yersinia enterocolitica* sorogrupo O:9, *Salmonella* grupo N e *Pseudomonas maltophila*, as quais possuem em comum a estrutura 4-amino-4,6-dideoxe-α-D-manopiranose, constituinte do lipopolissacarídeo O157 (Meng et al., 1994).

2.5.2.2 *Ampcor E.coli* O157:H7

Este kit é comercialmente disponibilizado pela Ridascreen-Biopharm, Camden, New Jersey, USA, e baseia-se em técnica de imunodifusão, em que a união do antígeno-anticorpo, incorporados em membrana própria, determinará o aparecimento de precipitado. Este precipitado apresenta-se como uma linha ou banda branca quinze minutos após a inoculação de alíquota de 0,1 mL, tomada a partir de enriquecimento de carne moída, durante 18 a 20 h a 37 °C, em caldo *BHI*. Diluições seriadas em APT, quando a concentração bacteriana testada ultrapassou a 10^8 UFC/g, foram aconselhadas.

2.5.2.3 *Visual immunoprecipitate assay, VIP™*

Esta técnica, comercialmente disponível pela BioControl Systems, Inc., USA, é recomendada pela AOAC (1998). O princípio do ensaio consiste na reação cromogênica do complexo antígeno-anticorpo que, uma vez formado, flui através de uma membrana para se ligar a novo anticorpo imobilizado sobre esta. Reação positiva é indicativa da presença de distintas linhas de precipitação, as quais, sobre fundo claro, apresentam-se escuras e estão presentes tanto para a amostra teste como para a janela de informação.

Oferece resultado presuntivo para *E.coli* O157:H7 em leite, carne bovina e avícola, bem como para seus subprodutos; frutos do mar; ovos líquidos;

massas alimentícias e frutas. Para a confirmação de colônias *VIP™*, testes bioquímicos e sorológicos são indicados.

2.5.2.4 *EHEC-TEK™*

Produzido pela Organon Teknika, Durham, NC, USA, fundamenta-se no ensaio de *Enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA*. Este ensaio é aplicado a amostras que foram enriquecidas em caldo *BHI* por 37 °C, durante 18 a 20 h. Diluições seriadas também são necessárias quando a densidade populacional ultrapassa 10^8 UFC/g. São tomadas para aquecimento a 100 °C por 20minutos, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição, as quais, após resfriamento à temperatura ambiente, são submetidas à avaliação em leitor de microplacas (modelo comercial NT-ELISA, Dr. S. Notermans, Bilthoven, The Netherlands), confirmando-se como positivas aquelas amostras que se mostrarem com valores de densidade ótica igual ou superior a 450 nm.

Dentre as formas mais comumente utilizadas para o ensaio de "ELISA", destaca-se o modelo sanduíche, ensaio de caráter não competitivo, no qual os anticorpos são adsorvidos em uma fase sólida e incubados com a amostra teste. A quantidade de antígeno adsorvido é medido lançando-se mão de anticorpos ligados à enzima conjugado. Após a adição do substrato - agente cromóforo - ocorrendo reação positiva, irá surgir coloração perceptível também a olho nu. Neste modelo, o antígeno deve dispor de pelo menos dois epitopos ou sítios de ligação para o anticorpo (Allen & Smith, 1987; Candlish, 1991).

2.5.2.5 *Tecra E.coli O157 visual immunoassay, VIA*

Colocado a venda pela Tecra Diagnostics, Sidney, Austrália, este ensaio prima pela sensibilidade relatada como sendo compatível à detecção de um

microrganismo/g de amostra pesquisada. É aplicável para carne e derivados, leite e derivados, e *swabs* de material clínico e ambiental, exigindo prévio enriquecimento seletivo, no decorrer de 18 h, em *mEC*+n; *mTSB*+n e *mEC*+n, respectivamente.

Neste método, exequível em tempo não superior a 20 h, são utilizados 0,1 mL de alíquotas que se aplicam em tiras de microtítulo previamente sensibilizadas com anticorpos purificados por cromatografia de alta afinidade. Resultados positivos, de acordo com o *ELISA*, modelo sanduíche, são visualizados através de coloração verde.

2.5.2.6 *EHEC Enzyme Immunoassay, EIA*

Também recomendada pela AOAC (1998) e vendida pela BioControl Systems, Inc., USA, constitui prova presuntiva para confirmação da presença de *E.coli* O157:H7 igualmente em leite, carne bovina e avícola, bem como seus subprodutos; frutos do mar; ovos líquidos; massas alimentícias e frutas.

Neste ensaio, anticorpos policlonais de alta especificidade são adsorvidos em orifícios de placa de microtítulo. Fosfatase alcalina é utilizada como enzima e o substrato p-nitrofenilfosfatase é o agente cromóforo que propiciará, em caso positivo, coloração amarela, passível de leitura de 405 a 410 nm. Amostras presuntivamente positivas devem ser confirmadas bioquimicamente.

2.5.2.7 *Enzyme Linked Fluorescent Assay, ELFA*

O procedimento conduzido nesta técnica inclui prévio enriquecimento da amostra teste, em meio de cultivo específico. Alíquota deste é colocada no primeiro compartimento do cartucho do equipamento Mini-vidas, bioMérieux, Craponne, France, de onde ponteira própria, devidamente adsorvida por

anticorpos, emerge automaticamente na amostra sendo esta aspirada e refluída várias vezes. Esta operação, em uma primeira etapa, promove a reação entre o antígeno solúvel presente no substrato a se analisar e o anticorpo adsorvido na ponteira. Em uma segunda etapa, o cartucho desloca-se horizontalmente, de forma a se obter o descarte do substrato para que, através de nova aspiração e refluxo, seja promovida a interação com o conjugado e conseqüente formação do imunocomplexo. Posteriormente, é utilizado o agente cromóforo 4-MUG, que em presença da enzima fosfatase alcalina é hidrolisado a metil-umbeliferona. O produto final obtido é enviado à cúpula de leitura e sendo excitado a 370 nm, passa a emitir fluorescência a 450 nm, cuja intensidade é captada por um sensor específico. O RFV, Valor Relativo de Fluorescência, é calculado e convertido pelo computador em resultado final do teste que indica, de maneira não discriminada, presença ou ausência de *E.coli* O157.

2.5.2.8 *Immunomagnetic Separation, IMS*

Alguns pesquisadores, antes da etapa de isolamento do microrganismo por semeadura em meios seletivos diferenciais, como por exemplo o Ágar MacConkey Sorbitol, optam pela utilização de uma técnica imunológica ainda recente e, portanto, pouco conhecida. Esta técnica, designada de *Immunomagnetic separation, IMS,* disponível como *Dynabeads anti-E.coli* O157 e comercializada pela *Dynal. Inc. Lake Success, N.Y.*, pode ser empregada para substratos alimentícios, água e material clínico, como sangue e fezes de origem animal e humana, para esta última exigindo-se apenas curto período de pré-enriquecimento em caldo GN Hajna ou *BPW*-vcc (Nataro & Kaper, 1998).

Essa técnica imunológica baseia-se na utilização de partículas metálicas superparamagnéticas revestidas de anticorpos específicos contra *E.coli* O157:H7, que irão aderir à sua superfície através de ligação antígeno-anticorpo. Esse

sistema é monitorado em um suporte que contém um ímã para atrair as partículas metálicas, promovendo-se, com esta estratégia, a concentração do microrganismo que fica retido a este, o que permite que o material restante seja facilmente escoado. O complexo aderido ao ímã é então ressuspendido e posteriomente semeado em meio sólido adequado. Devido à alta sensibilidade e especificidade, este método tem sido colocado dentre os mais acurados para a detecção de *E.coli* O157:H7, o que se confirma através dos resultados apresentados por Karch et al. (1987). Nesta pesquisa foi possível a detecção, em fezes, de *E.coli* O157 que se encontrava presente em número de 10^2 UFC, juntamente com uma população acompanhante de 10^7 UFC de coliformes/g.

A Tabela 3 relata de maneira específica as possibilidades de aplicação das técnicas imunológicas então apresentadas levando em conta, entre outros, a sensibilidade e o tempo de execução da análise.

2.5.3 Técnicas de caracterização genômica

Várias pesquisas vêm sendo realizadas em torno da caracterização de genes codificadores de fatores responsáveis pela patogenicidade da bactéria por intermédio de técnicas genéticas, destacando-se, até o presente momento, os ensaios de hibridização de DNA e *Polymerase Chain Reaction, PCR.*

Em *E.coli* O157:H7, essas técnicas estão direcionadas para a detecção de genes que codificam as toxinas *Stx*, mais comumente, ou dos fatores de virulência e de aderência.

2.5.3.1 Sondas genéticas

O teste de hibridização de DNA é realizado através de sondas genéticas, que nada mais são que segmentos de DNA de fita simples, capazes de

reconhecer e formar híbridos com fitas complementares de DNA ou RNA do microrganismo em teste, podendo ser radioativas ou colorimétricas. Os híbridos formados são capturados por um bastão específico que, após tratamento, é

TABELA 3 Avaliação comparativa de kits imunoenzimáticos empregados para detecção de *E.coli* O157:H7 a partir de diferentes substratos

Kits	Enriquecimento prévio	Resultado preliminar (h)	Confirmação posterior	Nível de detecção (UFC/g)	Presença de resultados falso-positivo (%)
Ampcor	+	6-8	+	10^4-10^6	Nd
Dynabeads anti-E.coli O157	+	6-8	+	10^2	Nd
EHEC-TEK™	+	24	+	0,2	Nd
E.coli O157 *latex*	+	26-28	+	Nd	Nd
ISO-GRID	+	46-48	+	1,5	Nd
Tecra E.coli O157	+	20	-	1	Nd

+: Necessário; UFC: Unidade Formadora de Colônia; -: Desnecessário; Nd: Não determinado; *Ampcor*: Ridascreen-Biopharm, Camden, New Jersey, USA;*Dynabeads anti-E.coli*O157: *Dynal. Inc Lake Success, N.Y.*; EHEC-TEK™ : Organon Teknika, Durham, NC, USA; *E.coli* O157 *latex* : OXOID, Basingstoke, UK; ISO - GRID: QA Life Sciences, Inc., San Diego, USA; Tecra *E.coli* O157: Tecra Diagnostics, Sidney, Australia.

introduzido em solução reveladora e a leitura realizada em equipamento adequado.

Este teste, porém, para ser eficiente, necessita da presença de 10^5 a 10^6 UFC/g ou mL, o que limita a sua sensibilidade.

Esta técnica ainda não pode ser usada especificamente para o sorotipo O157:H7, pois sabe-se que muitas cepas de EHEC, que possuem genes para *Stx*, não são patogênicas para o homem (Meng et al., 1994). Estudos realizados por Levine et al. (1984) identificaram uma sonda de DNA baseada na detecção do plasmídeo 60 MDa, comum ao sorotipo O157:H7, e outras EHEC. Esta sonda permitiu a hibridização de cerca de 99% de *E.coli* O157:H7; 77% de *E.coli* O26:H11 e 81% de outros sorotipos de EHEC.

Outras sondas já foram desenvolvidas, como aquelas derivadas do gene *eae*, e outra para a detecção de linhagens produtoras das toxinas Stx_1 e Stx_2, embora ambas estejam aptas a hibridizar outros sorotipos (O'Brien et al, 1993; Samadpour et al., 1994).

A sonda mais específica, capaz de apresentar melhores resultados, reagindo com exclusividade com o sorotipo O157, foi, contudo, desenvolvida por Feng (1993 apud Meng et al., 1994).

2.5.3.2 *Polymerase Chain Reaction, PCR multiplex*

A *PCR*, proposta por Mullis & Faloona (1987) permite a replicação *in vitro* de uma ou mais regiões do genoma a partir de ínfima quantidade de material biológico. A reação conta com os seguintes componentes: o DNA molde, uma enzima polimerase termo resistente - a *taq DNA polimerase*, os oligonucleotídeos iniciadores, que possuem em torno de 20 bases e reconhecem regiões de homologia ao longo do DNA molde e se pareiam nestas regiões, os dinucleotídeos trifosfatos (A,T,C,G), que são utilizados para a construção das fitas cópias e o íon Mg, que atua como um cofator na atividade da enzima. Para que a reação ocorra é necessária a seqüência de três ciclos térmicos, sendo o primeiro de 90 a 95 ^{0}C, no qual a dupla fita de DNA se desnatura. No segundo

ciclo, os iniciadores reconhecem regiões de homologia ao longo das fitas complementares e se pareiam às temperaturas de 45 a 50 ^{0}C, criando-se assim uma região de fita dupla em cada fita complementar. No terceiro ciclo, a enzima *taq DNA polimerase* irá replicar as fitas a partir desta região de fita dupla, à temperatura em torno de 72 ^{0}C. A cada ciclo de amplificação, o fragmento se multiplica exponencialmente, sendo usados em torno de 25 a 40 destes ciclos.

A *PCR multiplex* utiliza dois ou mais pares de iniciadores numa mesma reação, permitindo, assim, a amplificação de mais de uma região genômica ao mesmo tempo. Esta técnica proporciona uma maior especificidade na identificação de espécies, sendo bem aplicada no diagnóstico de doenças ou em análises de água e alimentos e material fecal, por meio de análise direta ou após diluição em caldos seletivos (Gannon et al., 1992; Ramotar et al., 1995; Fagan et al., 1999; Holland et al., 2000)

Pelo fato de amplificar regiões de genes específicos, a *PCR multiplex* deve ser aplicada na detecção de microrganismos para os quais se têm alguns genes específicos bem estudados.

Para a detecção de *Escherichia coli* enterohemorrágica, alguns autores vêm utilizando iniciadores que se pareiam em regiões de genes relacionados às toxinas Stx_1 e Stx_2, os fatores de virulência e aderência, EHEC-*hly* e *eae*A , e ainda aos antígenos somático O157 e falgelar H7 (Brian et al., 1992; Gannon et al., 1997; Weaver & Rowe, 1997; Paton & Paton, 1998; Tsen & Jian, 1998; Fagan et al., 1999; Maurer et al., 1999; Sharma et al., 1999; Holland et al., 2000)

De acordo com Gannon et al. (1992), a técnica de *PCR multiplex* pode ser aplicada na detecção de baixos níveis de organismos contendo *Stx*, presentes em carne moída e outros alimentos.

Estudos realizados em amostras de carne moída, após enriquecimento em caldo apropriado, demonstraram a capacidade da *PCR*, utilizando dois pares de iniciadores para as toxinas Stx_1 e Stx_2, de detectar entre 0,5 a 1 UFC de

E. coli produtora de *Stx/g*. A aplicação dessa mesma técnica a partir de material fecal mostrou sensibilidade de 10^2 UFC/0,1 g (Gannon et al., 1992; Ramotar et al., 1995).

Em conformidade com o transcrito nos itens 2.4 e 2.5, a Tabela 4 demonstra diferentes procedimentos analíticos considerados sob a ótica de distintos pesquisadores. De acordo com o tipo de substrato, são considerados igualmente, alimentos e material clínico, e ainda a possibilidade da presença de células injuriadas por condições adversas como calor e frio.

TABELA 4 Procedimentos analíticos adotados para detecção de *E.coli* O157:H7 a partir de diferentes substratos

Material	Metodologia aplicada				Referências dos Autores
	Pré-enriquecimento	Enriquecimento	Isolamento	Identificação	
Carne bovina moída	-	-	*SMAC*	Testes bioquímicos, sorológicos, Kit Petrifilm HEC	Franco (1999)
	APT	-	*SMAC*, *SMAC*-MUG	Testes bioquímicos e sorológicos	Viegas & Bechtel (1999)
	-	*mTSB*, *mEC*+n	*SMAC*-MUG, *SMAC*- CT	-	Martinez et al (1998)
	-	APT, *mEC*+n, *mTSB*+n, *EEB*	*SMAC*, *SMAC*- CT, *HC*	Testes bioquímicos, sorológicos, cultivo celular e hibridização	Marques & Landgraf (1997)
Cepa padrão estressada pelo calor, em meio *TSB*	–	–	*SMAC*+AP, *PRS*+APT, *TSA*+APT, ou *SMAC*, *SMAC*+ magnésio, *SMAC*-MUG, *PRS*-MUG	–	Ahmed & Conner (1995)
Cepas estressadas pelo calor, em meio *TSB*	Solução de Ringer	*TSA*, *TSA*+*TDPA*, *TSA*+ catalase	*SMAC*-MUG	*PCR*	McCleery & Rowe (1995)
Cepas estressadas pelo frio, em meio *TSB*	–	*TSA*	*SMAC*	–	McCleery & Rowe (1995)

"... continua..."

"TABELA 4, Cont."

Culturas puras em solução salina	*BHI*	*mTSB*+a-*HCl*, *mEC*+n	*SMAC*, *SMAC*-CT, *TSA*, Ágar FLS	Kits imunoenzimáticos, separação imunomagnética teste Verotox F, *PCR*	Heuvelink et al (1997)
Fezes	-	*mTSB*	*SMAC*, *SMAC*- CT	Testes bioquímicos, hibridização	Meitrich et al (1998)
Podutos cárneos (bovino, aves, ovinos e suínos)	-	*mTSB*+n	Ágar Macconkey + 30 µg de ácido nalidíxico/mL	Cultura de tecido, MiniVidas API20E	Doyle & Schoeni (1987)
Queijo tipo Minas estocado a baixas temperaturas	APT, APTm	-	*EMB*, caldo triptofano, caldo FLS, *SMAC*	Testes bioquímicos, sorológico e imunológico	Pereira et al (1999)

AP: ácido pirúvico; APT: água peptonada tamponada; APTm: água peptonada tamponada modificada; *BHI*: caldo de infusão de cérebro e coração, *Brain Hearth Infusion Broth*; *EMB*: ágar eosina azul de metileno, *Eosin Methylene Blue agar*; *EEB*: caldo tripiticaseína de soja modificado pela adição de cefixime, vancomicina e cefsulodina, *EHEC enrichment broth*; FLS: fluorocult lauril sulfato; HC: ágar HC; *mEC*+n: caldo *EC* modificado pela adição de novobiocina; *mTSB*: caldo tripticaseína de soja, *Tryptone Soy Broth*, modificado; *mTSB+a-HC*: caldo tripticaseína de soja, *Tryptone Soy Broth*, modificado pela adição de acriflavina-HCl; *mTSB*+n: caldo tripticaseína de soja, *Tryptone Soy Broth* modificado pela adição de novobiocina; *PCR*: reação de polimerase em cadeia, *Polymerase Chain Reaction*; *PRS*-MUG: ágar vermelho de fenol base, *PhenolRed broth base*, adicionado de sorbitol e reagente de MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo); *SMAC*: ágar MacConkey sorbitol, *sorbitol MacConkey agar*; *SMAC*-CT: ágar MacConkey sorbitol, *sorbitol MacConkey agar*, adicionado de cefixima e telurito de potássio; *SMAC*-MUG: ágar MacConkey sorbitol, *sorbitol MacConkey agar*, adicionado de reagente de MUG; *TDPA*: ágar tripticaseína de soja, *Tryptone Soy Agar*, acrescido de ácido 3,3'- tiodipropiônico; *TSA*: ágar tripticaseína de soja, *Tryptone Soy Agar*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Ensaio Piloto para avaliação da metodologia analítica tradicional - Detecção de *E.coli* O157:H7 em substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

3.1.1.1 Linhagem padrão de *E.coli* O157:H7

Linhagem padrão isolada em ambiente hospitalar a partir de paciente com síndrome hemolítica urêmica, *HUS*, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, na pessoa de seu Coordenador, Prof. Dr. Ernesto Hofer.

Esta linhagem, previamente avaliada quanto às condições de crescimento, de acordo com March & Ratnam (1986) e Zadik et al. (1993), comportamento bioquímico conforme descrição de Holt et al. (1992) e AOAC (1998) e quanto ao ensaio de imunoaglutinação por meio do teste *E.coli* O157 *latex*, disponibilizado pela Oxoid, Basingstoke, UK, apresentava as características expressas na Tabela 5.

3.1.1.2 Substratos

Foram utilizados 500 mL de leite bovino *in natura* fornecido pelo Centro de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal, CEDAF-UFV, Florestal, MG. Leite pasteurizado integral tipo C, 500 mL, disponível no comércio de Belo Horizonte, MG. A carne bovina, porção de patinho de aproximadamente 500 g, foi adquirida junto ao abatedouro do CEDAF-UFV, e foi posteriormente moída de forma asséptica e em condições laboratoriais. Amostra similar de carne bovina, também em porção de 500 g, foi diretamente

adquirida e moída em açougue localizado no Mercado Central de Belo Horizonte, MG.

Todas as amostras foram coletadas em período situado entre agosto e setembro de 2001, sendo transportadas ao Laboratório do Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular, SAEM, da Divisão de Bromatologia, Toxicolcogia e Medicamentos, DBTM, Instituto Octávio Magalhães, IOM, da Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte, MG, em condições de refrigeração por um período não superior a 4h.

TABELA 5 Principais aspectos bioquímicos, imunológicos e de crescimento de *E.coli* O157:H7

Cepa padrão (procedência)	Perfil de comportamento			
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ	Não fermenta celobiose e sorbitol; não produz βmetil-umbeliferil-glucuronidase	Reage ao teste *E.coli* O157 *latex*, Oxoid, em tempo inferior a 1 minuto	É móvel em ágar semi-sólido, conforme Cragie (Hofer, 2000)	Apresenta colônias marrons, com bordas bem definidas, arredondadas e translúcidas em ágar *SMAC*- CT; não fluoresce em ágar *SMAC*- MUG

SMAC-CT: ágar MacConkey Sorbitol acrescido de Cefixima e Telurito de potássio (Zadik et al, 1993); *SMAC*-MUG: ágar MacConkey Sorbitol acrescido de reagente MUG, 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo (March & Ratnam, 1986); Hofer, E. (2000): comunicação pessoal[2]

[2] Prof. Dr.Ernesto Hofer
Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia.
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Caixa Postal 926, CEP: 21045-900
Rio de Janeiro RJ

3.1.2 Otimização da técnica de biologia molecular – *PCR multiplex*

3.1.2.1 Extração e quantificação do DNA de *E.coli* O157:H7 e otimização da técnica

- Linhagem padrão

Foi utilizada a mesma linhagem padrão anteriormente descrita no item 3.1.1.1.

- Iniciadores moleculares específicos

Foram selecionados quatro pares de iniciadores responsáveis pela amplificação de quatro regiões genômicas específicas e relativas ao antígeno somático O157; verotoxina VT1; fator de aderência *eae*A e hemolisina EHEC-*hly*, produzidas por *E.coli* O157:H7, conforme listado na Tabela 6.

3.1.2.2 Ensaio Piloto para detecção de *E.coli* O157:H7 em substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

- Substratos

Foram utilizados os mesmos substratos descritos no item 3.1.1.2.

- Crescimento de *E.coli* O157:H7 em meios sólidos diferenciais

Conforme Ensaio Piloto, descrito no item 3.2.1.2, foi estudada uma média de três colônias suspeitas de *E.coli* O157:H7, a partir dos meios sólidos seletivos diferenciais *SMAC*-CT e *SMAC*-MUG, provenientes de cada substrato alimentício, leite *in natura*, leite pasteurizado tipo C e carne bovina moída, amostras procedentes do CEDAF-UFV e do Mercado Central, Belo Horizonte, MG, perfazendo um total de 256 colônias.

3.1.3 Pesquisa de *E.coli* O157:H7 enquanto contaminante natural em material clínico e alimentos de origem bovina usando a metodologia analítica tradicional e a técnica de *PCR multiplex*

3.1.3.1 Material fecal de fêmeas bovinas em fase de lactação

Foi coletado um total de 30 amostras de *swab* retal de fêmeas bovinas sadias e em fase de lactação, animais estes aleatoriamente selecionados junto ao plantel do CEDAF-UFV.

No período compreendido entre janeiro e fevereiro de 2002, dez amostras quinzenais deste material clínico foram adquiridas, estocadas à temperatura de refrigeração e transportadas até ao laboratório do SAEM-FUNED, em tempo não superior a 4h.

3.1.3.2 Leite *in natura*

Em caso de positividade para a presença de *E.coli* O157:H7 nas amostras fecais das fêmeas bovinas, conforme o anteriormente descrito e proposto no item 3.1.3.1, estes animais teriam seu leite ordenhado e analisado.

Assim alíquotas de 500 mL de leite *in natura* até dez amostras para cada uma das fêmeas positivadas, seriam quinzenalmente estudadas, no período compreendido entre março e maio de 2002.

Uma vez coletadas, as amostras seriam estocadas à temperatura de refrigeração e transportadas até ao laboratório do SAEM-FUNED, em tempo não superior a 4 h.

3.1.3.3 Carne bovina moída destinada ao preparo industrial de hambúrguer

Um total de 30 amostras de carne bovina moída, dez alíquotas individuais de 500 g, foram coletadas conforme três diferentes fornecedores que atendem a uma Indústria de Produtos Cárneos localizada no município de Contagem, MG.

TABELA 6 Iniciadores específicos para amplificação de quatro regiões genômicas distintas de *E.coli* O157:H7 por intermédio da técnica de *PCR multiplex*

Iniciadores	Região Genômica Amplificada	Seqüências Nucleotídicas (5′ → 3′)	Produto Esperado (pb)	Referência Bibliográfica
A	Antígeno O157-Fw	CGT GAT GAT GTT GAG TTG	420	Maurer et al. (1999)
B	Antígeno O157-Rv	AGA TTG GTT GGC ATT ACT G	420	Maurer et al. (1999)
C	Verotoxina VT1 (SLT1)-Fw	ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG	614	Gannon et al. (1992), Holland et al. (2000)
D	Verotoxina VT1 (SLT1)-Rv	CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	614	Gannon et a.l (1992), Holland et al. (2000)
E	Gene *eae*A O157:H7-Fw	AAG CGA CTG AGG TCA CT	450	Holland et al. (2000)
F	Gene *eae*A O157:H7-Rv	ACG CTG CTC ACT AGA TGT	450	Holland et al. (2000)
G	Hemolisina *hly*-Fw	ACG ATG TGG TTT ATT CT GGA	165	Fagan et al. (1999)
H	Hemolisina *hly*-Rv	CTT CAC GTG ACC ATA CA TAT	165	Fagan et al. (1999)

Fw, "Foward": sequência direta; Rv, "Reverse": sequência inversa

A carne moída destinada ao fabrico de hambúrguer foi semanalmente amostrada em período situado entre março e abril de 2002.

Uma vez coletadas, as amostras foram estocadas à temperatura de refrigeração e transportadas até o Laboratório, em tempo não superior 4 h.

3.1.4 Equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes

- Acetato de Sódio 3 M, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Agarose Molecular Grade, Gibco BRL, Life Technologies do Brasil LTDA, SP;
- Agitador orbital, modelo MA420, com controle de tempo, rotação e temperatura, Steinheim, Germany ;
- Brometo de Etídio 10 mg/mL, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Cloreto de Magnésio 25 mM, 50 mM, Promega, Corporation Madison, USA;
- Cuba para Eletroforese Horizontal, Life Technologies do Brasil LTDA, SP;
- dNTP's Set, 2'-deoxinucleotídeo-5'-trifosfato 100 mM each, Pharmacia Biotech do Brasil LTDA, SP;
- *E.coli O157 latex*, teste imunológico, Oxoid, Basingstoke, UK;
- EDTA, Ácido EtilenoDiAminoTetracético 0.5 M, pH 8,0, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Enzima Taq Dna Polimerase 5 U/μL e Tampão 10X, Promega, Corporation Madison, USA;
- FCAI, Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico, proporção de 25:24:01, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Iniciadores Específicos, Invitrogen, Life Tecnologies do Brasil LTDA, SP;
- Lisozima 25 mg/mL, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Microcentrífuga refrigerada, Jouan, Saint Herblain, France;
- Microtubos de parede fina específicos para PCR 0,2 mL, Gibco BRL , Life Technologies do Brasil LTDA, SP;
- *mEC*+n, caldo *EC* modificado e acrescido de solução de novobiocina, pessoalmente formulado em Laboratório, segundo Okrend et al. (1990a) (Anexo B, pág. 84);
- *mTSB*+n, caldo Tripticaseína de Soja modificado e acrescido de solução de novobiocina, pessoalmente formulado em Laboratório, segundo Doyle &

Schoeni (1987) (Anexo B, pág. 84);

- N-lauril-sarcosina, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Padrão de peso molecular ϕ174HaeIII, Amersham Pharmacia Biotech do Brasil LTDA, SP;
- Padrão de peso molecular λHindIII, Amersham Pharmacia Biotech do Brasil LTDA, SP;
- Proteinase K 20 mg/mL, Promega, Corporation Madison, USA;
- Reagente MUG, 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo, Oxoid LTD, Basingostoke, Hampshire, England;
- Sistema EDAS de Fotodocumentação, Kodak Digital Science DC120, Zoom Digital Camera, ,Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA ;
- *SMAC*-CT, ágar MacConkey Sorbitol acrescido de Cefixima e Telurito de potássio, pessoalmente formulado em Laboratório, segundo Zadik et al. (1993) (Anexo B, pág. 84);
- *SMAC*-MUG, ágar MacConkey Sorbitol acrescido do reagente MUG, 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo, pessoalmente formulado em Laboratório, segundo March & Ratnam (1986) (Anexo B, pág. 84);
- Solução cefixima-telurito, pessoalmente preparada em Laboratório (Anexo B, pág. 85);
- Solução de novobiocina, pessoalmente preparada em Laboratório (Anexo B, pág. 85);
- Homogeneizador, modelo 400, Seward Medical Limited, London, United Kingdom;
- Tampão da amostra 6X, Azul Bromofenol e Xileno Cianol 0,5% e Ficol 1,5%;
- Tampão fosfato 10mM acrescido de Sacarose 20% ;
- Tampão SSC, Citrato de Sódio 15 mM e NaCl 150 mM;
- Tampão TBE 1X, Tris 89 mM, Borato 89 mM e EDTA 2 mM;

- Tampão TE 10:1, Tris-HCl 1 0mM, EDTA 1 mM, pH 8,0;
- Tampão TE 50:20, Tris-HCl 50mM, EDTA 20mM, pH 8,0;
- Termociclador PTC 100, MJ Research, Inc., Michigan, USA;
- Transluminador de luz ultravioleta, Gibco BRL, Life Technologies do Brasil LTDA, São Paulo, SP;
- Tris-hidroximetil amino metano 1M, pH 7,5, Sigma, Aldrich Chemie, Steinheim, Germany;
- Outros equipamentos, meios de cultivo laboratorial e reagentes de uso geral em laboratório.

3.2 Procedimentos analíticos

Os procedimentos adotados encontram-se apresentados na Figura 1.

3.2.1 Ensaio Piloto para avaliação da metodologia analítica tradicional - Detecção de *E.coli* O157:H7 em substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

3.2.1.1 Inoculação artificial

Substratos alimentícios, de acordo com o discriminado no item 3.1.1.2, foram artificialmente inoculados com a linhagem padrão de *E.coli* O157:H7.

A densidade populacional do microrganismo foi estabelecida de acordo com leitura de absorvância a 550nm e contagem de células a partir de diluições seriadas em *PCA*, de forma a se obter inóculo inicial, tempo zero, aproximado em 10^2 UFC/g ou mL de alimento (Anexo A).

Paralelamente a esta etapa de inoculação, os substratos em questão foram analisados quanto à presença de *E.coli* O157:H7 a fim de se descartar a possibilidade da contaminação natural com este microrganismo. Para tal, utilizaram-se protocolos idênticos àqueles descritos no Ensaio Piloto (item 3.2.1.2).

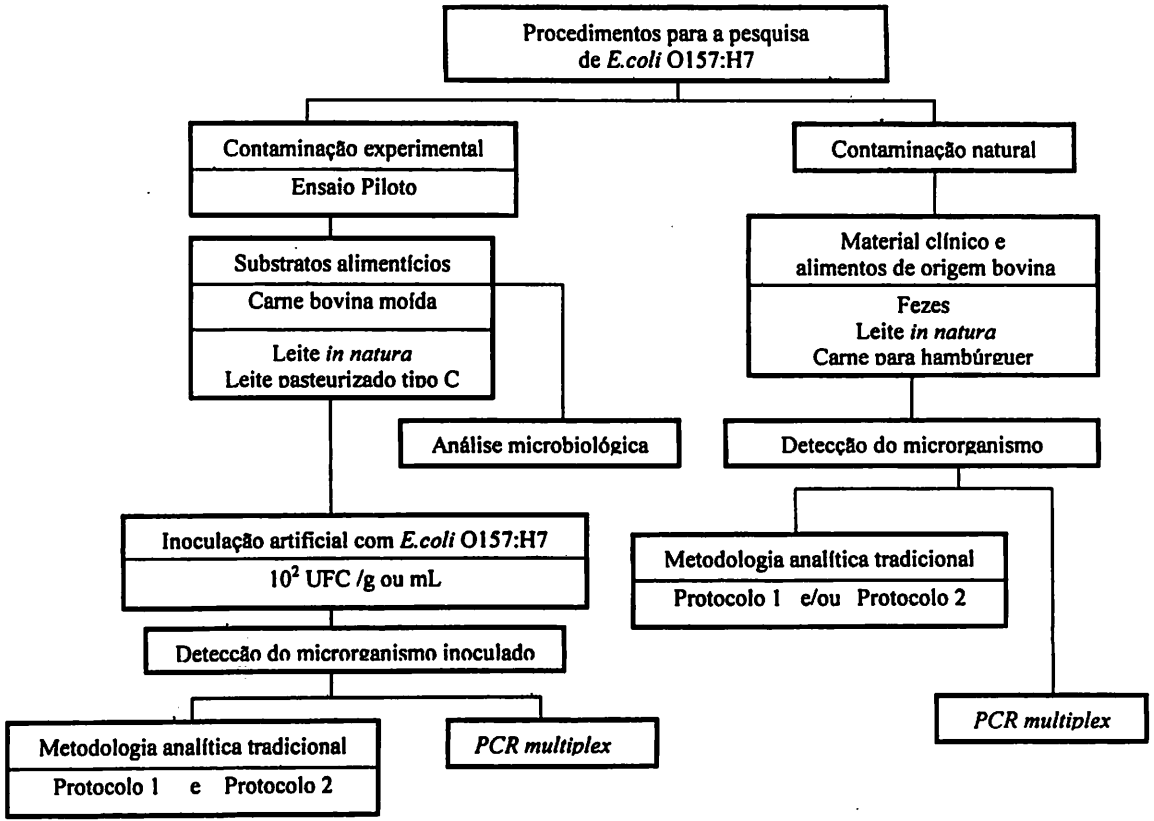

FIGURA 1 Procedimentos analíticos adotados para pesquisa de *E.coli* O157:H7

Estes mesmos substratos foram ainda estudados quanto à presença ou não de outras bactérias patogênicas e indicadoras de condições higiênico-sanitárias.

Desta maneira, pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* foi realizada, adotando-se procedimentos propostos por Vanderzant & Splittstoesser (1992).

Quanto às bactérias indicadoras, foram feitas, em todos os substratos, contagens de bactérias termotolerantes e estafilococos coagulase positiva.

Para as amostras de leite *in natura* e pasteurizado e de carne bovina moída, procedentes do CEDAF-UFV e diretamente coletadas no comércio de Belo Horizonte, MG, incluiu-se a enumeração de bactérias heterotróficas mesófilas e clostrídios sulfito redutores, respectivamente (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

3.2.1.2 Detecção do microrganismo

Após o período de 24 h de incubação, os quatro substratos alimentícios pesquisados foram, de maneira isolada, avaliados qualitativamente tendo em vista a recuperação de *E.coli* O157:H7, conforme se apresenta no Fluxograma da Figura 2.

Dois Protocolos de Pesquisa, Protocolo 1 e Protocolo 2, voltados à metodologia tradicional, foram propostos e, em triplicata, paralelamente conduzidos, conforme se explana a seguir:

O procedimento analítico delineado no Protocolo 1 constou de pré-enriquecimento de 25 g ou 25 mL da amostra em 225 mL de APT. Já o Protocolo 2 partiu da inoculação de 25 g ou 25 mL diretamente para 225 mL dos caldos *mTSB*+n e *mEC*+n, caracterizando o enriquecimento seletivo, respectivamente, de acordo com Doyle & Schoeni (1987) e Okrend et al.(1990).

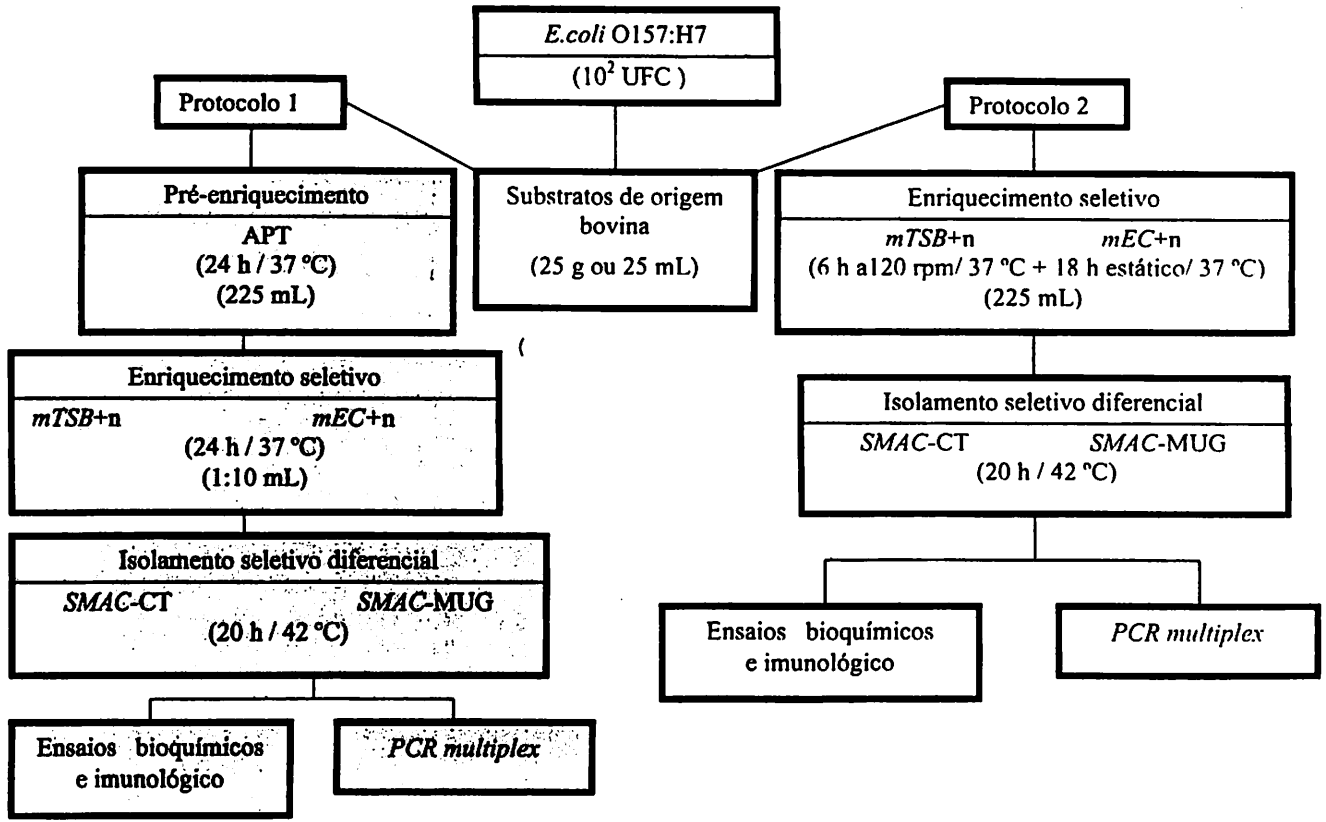

FIGURA 2 Procedimentos analíticos concernentes à metodologia tradicional empregada para detecção de *E..coli* O157:H7, em Ensaio Piloto. Substratos: leite *in natura*, leite pasteurizado tipo C e carne bovina moída

No Protocolo 1, o enriquecimento seletivo veio a ocorrer após 24 h de incubação a 37 °C, transferindo-se, neste caso, 0,1 mL do pré-enriquecimento para 10 mL dos caldos *mTSB*+n e *mEC*+n, que também foram incubados a 37 °C por 24 h (Doyle & Schoeni, 1987; Okrend et al.,1990a).

Por sua vez, o Protocolo 2 teve os frascos contendo os caldos *mTSB*+n e *mEC*+n incubados em *Shaker* MA420 digital. Neste aparelho foi previamente programada uma incubação inicial com agitação a 120 rpm por 6 h a 37 °C, seguindo-se de cultivo estático por mais 18 h à mesma temperatura.

Para ambos os Protocolos, o isolamento diferencial implicou em inoculação por estrias, com auxílio de alça de níquel-cromo, nos meios sólidos diferenciais, ágar *SMAC*-CT e ágar *SMAC*-MUG, seguindo-se de incubação a 42 °C até, no máximo, 20 h (Levine, 1987; Okrend et al.,1990a).

Decorrido este período de incubação, um total de três colônias que apresentavam características da cepa padrão de *E.coli* O157:H7, aquelas características descritas na Tabela 5, item 3.1.1.1, foram visualmente avaliadas a partir de cada placa de *SMAC*-CT e *SMAC*-MUG, de acordo com Zadik et al. (1993) e March & Ratnam (1986).

As colônias assim identificadas foram transferidas para cultivo em caldo *BHI* e posteriormente semeadas em ágar nutriente a fim de se dar prosseguimento aos testes de confirmação de *E.*coli O157:H7.

Realizaram-se então ensaios bioquímicos de acordo com AOAC (1998) e Holt et al. (1992); ensaios de imunoaglutinação por meio do teste *E.coli* O157 *latex*, disponibilizado pela Oxoid, Basingstoke, UK.

Aplicou-se, ainda, a técnica de *PCR multiplex*, conforme Gannon et al. (1992); Fagan et al. (1999); Maurer et al. (1999) e Holland et al. (2000).

3.2.2 Técnica de *PCR multiplex*

3.2.2.1 Extração e quantificação do DNA de *E.coli* O157:H7

A etapa de extração de DNA foi realizada segundo procedimento especialmente modificado a partir de Jersek et al. (1996).

Este procedimento constou de quatro passos distintos, os quais incluíram lavagem, lise celular, purificação e precipitação dos ácidos nucléicos, conforme abaixo se explana.

Para se efetuar o primeiro passo, 1,5 mL da cultura foi retirado e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, a 4 °C. Desprezou-se então o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1mL de tampão SSC - Citrato de Sódio 15 mM; NaCl 150 mM - e centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas.

Para o segundo passo, o sedimento celular obtido foi então ressuspendido em 100 µL de tampão de lise, tampão fosfato 10 mM e sacarose 20% acrescido de 4 mg de lisozima, e mantido a 37 °C por 45 minutos. A este sedimento adicionaram-se 200 µL de tampão TE 50:20, 100 µL de sarcosil 5% e 100 µL de proteinase K e a mistura foi mantida primeiramente a 37 °C por 30 minutos e posteriormente a 50 °C, por mais 60 minutos.

No terceiro passo, as células anteriormente lavadas e lisadas foram submetidas a três extrações seriadas e consecutivas para a purificação do DNA. Estas extrações foram procedidas com a utilização de FCAI na proporção de 25:24:1, utilizando-se volumes aproximados de 500 µL para cada uma. Após a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante resultante contendo o DNA foi recuperado por intermédio de ponteiras cortadas especificamente para este fim, sendo descartado o sedimento que continha outras proteínas excludentes.

Já no quarto passo, para proceder a precipitação do DNA, foi a este acrescido 1/10 volume de acetato de sódio 3 M e etanol absoluto gelado permanecendo esta mistura a -20 °C por 4 h.

Decorrido este tempo, o DNA assim obtido foi então recuperado por centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos, seguindo-se de tratamento com solução de etanol a 70% e posterior secagem à temperatura ambiente.

Pronto para ser conservado, o DNA então preparado foi suspenso em solução tampão TE 10:1 evmantido em tubo de Eppendorf sob refrigeração a 4 °C.

A quantificação do DNA de *E.coli* O157:H7 assim obtido foi realizada por intermédio da análise comparativa de intensidade das bandas de DNA íntegro de bacteriófago Lambda de peso conhecido, que variava de 50 a 400 ng.

Para tanto, foram tomados quatro volumes distintos da solução TE 10:1 contendo o DNA, estes foram misturados ao tampão da amostra 1X e, então, aplicados nas canaletas do gel de agarose preparado a 1% para se proceder a separação por eletroforese, a 5 V/cm, na presença de tampão TBE 1X.

Após coloração do gel de agarose com brometo de etídio, na concentração de 1 μg/mL, as bandas geradas foram observadas em transluminador em presença de luz ultravioleta e, posteriromente, registradas por fotografias por meio do Sistema EDAS de Fotodocumentação.

3.2.2.2 Otimização da técnica de *PCR multiplex*

Trabalhou-se, inicialmente, com a técnica de *PCR* voltada à detecção de *E.coli* O157:H7, utilizando-se quatro pares distintos de iniciadores direcionados à quatro regiões genômicas desta cepa padrão.

De acordo com o estabelecido na literatura, foram adotados os iniciadores A e B para o antígeno somático O157; C e D para a verotoxina VT1; E e F para a aderência *eae*A O157:H7 e G e H para a hemolisina EHEC-*hly*;

de acordo com Gannon et al. (1992), Fagan et al. (1999), Maurer et al. (1999) e Holland et al. (2000) e conforme já detalhadamente descrito na Tabela 6.

Tendo em vista o anelamento do DNA, a condição térmica para a realização de cada uma destas reações foi inicialmente testada exatamente conforme proposto pelos mesmos autores supracitados, ou seja, iniciadores A e B: 55 °C; C e D: 57 °C; E e F: 55 °C; G e H: 58 °C.

O teor ou conteúdo dos iniciadores foram avaliados em diferentes concentrações, que variavam de 6 pmol/µL a 50 pmol/µL.

Para a elaboração de uma Reação Múltipla de Polimerase em Cadeia, *PCR multiplex*, foram utilizados concomitantemente os mesmos quatro pares de iniciadores, adotando-se para tal valores médios de temperatura e concentração de cada iniciador, ou seja, 56 °C e 25 pmol, e definindo-se 30 µL como volume final.

Este volume continha 10 mM de Tris-HCl em pH 9,0 + 50 mM de KCl + 0,1% de Triton X-100 + 2,5 mM de $MgCl_2$ + 0,2 mM de dNTP's + 1,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase + 25 pmol de cada iniciador de A a H + 2 µL do DNA.

O programa de amplificação de DNA adotado no Termociclador PTC 100, para a utilização simultânea dos quatro pares de iniciadores, foi: 94 °C por 5 minutos, para a desnaturação inicial do DNA; 56 °C por 1 minuto, para o pareamento com os iniciadores; extensão a 72 °C por 1 minuto, para síntese de novas fitas; e reinício da desnaturação a 94 °C por 30 segundos. A extensão final, para o encerramento da reação, ocorria a 72 °C por 5 minutos.

Após amplificação, os produtos da *PCR multiplex* foram acrescidos de 5 µL tampão da amostra concentrado seis vezes e 10 µL da mistura, separados por eletroforese em gel de agarose, preparado a 1,0% e tampão TBE concentrado uma vez, a 5 V/cm. Como padrão de peso molecular foram

utilizados 10 µL de bacterófago λ cortado com enzima *Hind*III e 10 µL de ϕ174*Ha*III.

Após a coloração do gel de agarose com brometo de etídio na concentração de 1 µg/mL, as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Os resultados foram registrados por fotografias em Sistema EDAS de Fotodocumentação.

De modo a se confirmar a eficácia e extensão de uso da reação de *PCR multiplex*, foram testadas cinco modalidades ou situações distintas envolvendo a mesma cepa padrão de *E.coli* O157:H7, conforme abaixo se descreve:

Uso direto de DNA extraído – 2 µL contendo 80ng do ácido desoxirribonucléico, de acordo com o descrito no item 3.2.2.1

Uso de crescimento bacteriano em meio sólido – pequena porção de uma colônia isolada a partir de ágar *BHI*, em cultivo de 24h

Uso de crescimento bacteriano em meio líquido – 5 µL de cultivo em caldo *BHI*

Uso direto de substrato alimentício líquido – 5 µL de leite *in natura* artificialmente inoculado com o microrganismo, de acordo com o descrito no item 3.2.1.1

Uso indireto de substrato alimentício sólido – 5 µL do caldo do pré-enriquecimento, APT, após 24 h de incubação a 37 °C com 25 g de carne bovina moída, de acordo com o descrito no item 3.2.1.1

Excetuando as amostras das situações *DNA extraído* e *crescimento bacteriano em meio sólido*, todas as três outras amostras foram submetidas a tratamento térmico em forno de microondas por 1 minuto em potência alta, tendo em vista a promoção de lise celular.

Assim tratadas, todas as amostras foram avaliadas frente à técnica de *PCR multiplex*, conforme descrito na pág.49, adotando-se igualmente os mesmos procedimentos para o registro e documentação dos resultados.

Uma vez confirmadas a eficácia e extensão do uso da reação de *PCR multiplex* então proposta, o ensaio de especificidade para a cepa padrão de *E.coli* O157:H7 foi realizado selecionando-se, de maneira exclusiva, a situação *Uso de crescimento bacteriano em meio sólido.*

Para tal, elegeram-se bactérias Gram positivas - *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Rodococcus eqüii* e *Streptococcus sp.*- e bactérias Gram negativas - *Enterobacter* sp, *Klebsiella ozanae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* tiphi, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* – todas procedentes da Coleção de Cultura do SAEM, FUNED, Belo Horizonte, MG.

3.2.2.3 Ensaio Piloto para a avaliação da técnica de *PCR multiplex* - Detecção direta de *E.coli* O157:H7 a partir dos substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

Após o período de 24 h de incubação, as amostras de leite *in natura* e carne bovina moída adquiridas no CEDAF-UFV e inoculada conforme descrito no item 3.2.1.1 foram, de maneira isolada, avaliada qualitativamente quanto à presença de *E.coli* O157:H7.

Uma alíquota de 5 µL de leite *in natura* e outra de 5 µL do caldo de pré-enriquecimento APT contendo carne moída bovina foram tomados para se realizar a pesquisa direta do microrganismo através da técnica de *PCR multiplex*.

Para tanto adotaram-se os procedimentos descritos no item 3.2.2.2, no que se refere à obtenção da lise celular, reação da *PCR multiplex*, programa de amplificação do DNA e registro dos resultados.

- Confirmação de identidade de *E.coli* O157:H7 previamente isolada a partir dos substratos inoculados

Aquelas colônias isoladas por intermédio da metodologia analítica tradicional em meios sólidos diferenciais, em número de 246, procedimento descrito no item 3.2.1.2, e destinadas aos ensaios bioquímicos e de imunoaglutinação foram, paralelamente, avaliadas quanto à presença de genes que codificam o antígeno somático O157, verotoxina VT1, fator de aderência *eae*A e hemolisina EHEC-*hly*, para a devida confirmação como *E.coli* O157:H7.

Uma pequena fração ou raspagem de cada colônia foi colocada em tubos de Eppendorf, com auxílio de palitos de madeira estéreis, e aos tubos foi acrescida a mistura da reação de *PCR multiplex* otimizada e descrita no item 3.2.2.2.

3.2.3 Pesquisa de *E.coli* O157:H7 enquanto contaminante natural em material clínico e alimentos de origem bovina usando a metodologia analítica tradicional e a técnica de *PCR multiplex*

No que se refere à metodologia analítica tradicional, caso através do Ensaio Piloto viesse a se confirmar um dos Protocolos como aquele que apresentasse melhor resultado, este seria selecionado para a pesquisa de *E.coli* O157:H7 enquanto contaminante natural de material clínico e substratos de origem bovina.

Em caso negativo, seriam aplicados ambos os Protocolos de Pesquisa.

3.2.3.1 Material fecal de fêmeas bovinas em fase de lactação

A coleta de material fecal, conduzida por funcionário técnico do CEDAF-UFV, realizou-se segundo procedimento descrito na Figura 3 e conforme ora se delinea:

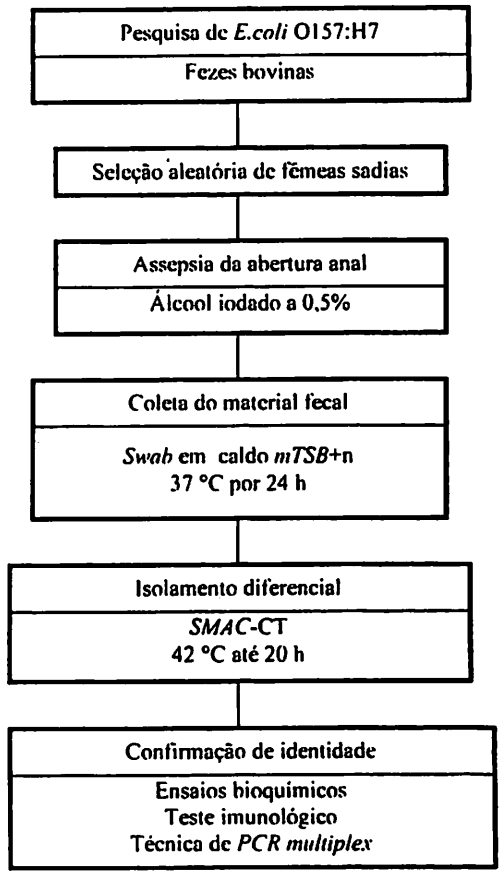

FIGURA 3 Procedimento analítico para a avaliação da contaminação natural de *E.coli O*157:H7 em material fecal de fêmeas bovinas em fase de lactação

As fêmeas bovinas em fase de lactação foram inicialmente submetidas à assepsia da abertura anal, para a qual foram utilizados cerca de 100 mL de solução de álcool iodado a 0,5%.

Para a amostragem do material situado na parede do reto destes animais, o responsável técnico introduziu seu antebraço vestido de luva de poliestireno e, com auxílio de movimentos circulares, removeu porções de fezes ali presentes.

Descartou-se o excesso de material coletado e o restante das fezes aderidas à superfície da luva foi retirado com *swab* embebida em caldo *mTSB*+n contido em tubo de rosca com tampa de baquelite.

O material fecal assim coletado e mantido no mesmo tubo contendo caldo *mTSB*+n foi transportado, em condições isotérmicas, até ao laboratório do SAEM-FUNED e incubado por 24 h a 37 °C.

Após este tempo, semeaduras foram efetuadas em ágar *SMAC*-CT incubado a 42 °C durante 20 h.

Do crescimento obtido nesse meio, colônias típicas foram pescadas e submetidas a ensaios bioquímicos e de imunoaglutinação e à técnica de *PCR multiplex*, conforme relatado nos itens 3.2.1.2 e 3.2.2.3.

3.2.3.2 Leite *in natura*

Somente em caso de positividade para a presença de *E.coli* O157:H7 nas amostras fecais das fêmeas bovinas, conforme anteriormente descrito no item 3.2.3.1, seria conduzida a pesquisa do microrganismo no leite *in natura* destas.

Para tal seriam adotados Protocolos de Pesquisa evidenciados no Ensaio Piloto descrito no item 3.2.1.2.

De igual forma, confirmação de identidade de *E.coli* O157:H7 neste produto seria realizada pela técnica de *PCR multiplex*, conforme descrito no item 3.2.2.3.

3.2.3.3 Carne bovina moída destinada ao preparo industrial de hambúrguer

Foram adotados Protocolos de Pesquisa evidenciados no Ensaio Piloto descrito no item 3.2.1.2.

De igual forma, confirmação de identidade de *E.coli* O157:H foi realizada pela técnica de *PCR multiplex*, de acordo com procedimento descrito no item 3.2.2.3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Do Ensaio Piloto para avaliação da metodologia analítica tradicional - Detecção de *E.coli* O157:H7 em substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

Por intermédio da análise microbiológica realizada nos quatro substratos, *leite in natura*, leite pasteurizado tipo C e carne bovina moída, amostras procedente do CEDAF-UFV e do Mercado Central, Belo Horizonte, MG, não foi evidenciada a presença de *E.coli* O157:H7.

Desta maneira, ficou descartada a possibilidade da contaminação natural com o microrganismo, tornando-se estes substratos aptos para a inoculação experimental com a cepa padrão que se propunha.

Em relação às bactérias patogênicas, somente o substrato carne bovina moída adquirida no Mercado Central, Belo Horizonte, MG apresentou *Salmonella* dos grupos C e D.

Quanto aos microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias, conforme dado não apresentado em Tabela, coliformes termotolerantes mostraram contagens da ordem de 10^3, 10^2, 10^3 e 10 NMP/mL ou g para os substratos leite *in natura*, pasteurizado tipo C e carne bovina moída, amostras procedentes do Mercado Central, Belo Horizonte, MG, e do CEDAF-UFV, respectivamente.

As bactérias heterotróficas mesófilas apresentaram contagens de 10^3 UFC/mL para leite *in natura* e 2,5 x 10 UFC/mL para leite pasteurizado tipo C.

Os demais microrganismos pesquisados, clostrídios sulfito redutores e estafilococos coagulase positivos, revelaram-se ausentes em todos os substratos estudados.

Os resultados ora relatados condizem com aqueles voltados ao estudo microbiológico de produtos de origem bovina, tanto para leite como para carne.

Em se considerando os valores limites preconizados pela Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001, de acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério de Saúde (Brasil, 2001), todos os substratos alimentícios então analisados mostraram-se de acordo com as especificações legais, com exceção da carne moída bovina adquirida no Mercado Central, Belo Horizonte, MG, tendo em vista a constatação da presença de *Salmonella* dos grupos C e D.

Mesmo constatando a população média de coliformes termotolerantes da ordem de 10^4 NMP/mL ou g em amostras de leite e carne moída bovina, e ainda nesta última a presença de *Salmonella* dos grupos C e D na amostra adquirirda no Mercado Central, Belo Horizonte, MG, estes não interferiram na recuperação de *E.coli* O157:H7.

Resultados similares foram obtidos por Saad & Franco (1999) quando avaliaram a influência da microbiota natural em carne crua moída. Estes autores relataram a presença de *E.coli* não patogênicas, *Pseudomonas putida* e *Leuconostoc* sp. quando de estudos da recuperação do microrganismo em diferentes níveis populacionais e distintas condições ambientais, tendo sido o mesmo recuperado de forma indistinta.

Quanto aos resultados apresentados pelos caldos seletivos *mTSB*+n e *mEC*+n estes mostraram, neste experimento de caráter meramente qualitativo, eficácia semelhante na inibição da microbiota acompanhante, não tendo sido observada qualquer diferença ou variação no tocante à associação destes aos meios sólidos seletivos *SMAC*-MUG e *SMAC*-CT.

Alguns estudos, contudo, já apontaram o caldo *mEC*+n, proposto por Okrend et al. (1990a), como de eficácia ligeiramente superior sobre o caldo *mTSB*+n, desenvolvido por Doyle & Schoeni (1987), a saber pelos níveis de

detecção da ordem de 0,6 células/g de carne bovina moída, para o primeiro, frente a 10 células/g do mesmo substrato alimentício, para o segundo.

No Brasil, resultado de melhor eficácia do caldo *mEC*+n já foi igualmente relatado por Marques (1997) e Manhani (2000), ambos trabalhando com associações deste mesmo caldo com até quatro meios sólidos seletivos.

Quanto à capacidade de colonização, visualização e reconhecimento de colônias da cepa padrão de *E.coli* O157:H7, o ágar seletivo *SMAC*-CT, proposto por Zadik et al. (1993), apresentou, neste experimento, maior poder de inibição sobre a microbiota acompanhante em relação ao ágar *SMAC*-MUG, proposto por March & Ratnam (1986).

Esta inibição foi observada, sobretudo, para outras *E.coli*, aquelas fermentadoras de sorbitol, e outras enterais, sobretudo *Proteus* sp.

De acordo com Chapman et al. (1991), Zadik et al. (1993) e Heuvelink et al. (1997), bactérias dos grupos *Proteus*, *Providencia e Aeromonas* são, neste ágar, inibidas pela presença de cefixima, na concentração de 0,05mg/L, e telurito de potássio, na concentração de 2,5mg/L.

Segundo March & Ratnam (1986), a reconhecida eficácia no isolamento de *E.coli* O157:H7 observada com o uso do ágar *SMAC*-CT tem estendido a sua aplicação, que não mais se restringe à análise de alimentos, para amostras de origem clínica.

No que concerne à confirmação bioquímica e sorológica de colônias típicas suspeitas de *E.coli* O157:H7, oriundas de crescimento nos meios sólidos seletivos, foi pescado um total de 256 amostras bacterianas.

Estas linhagens, na proporção 1:1, conforme procedência dos dois Protocolos de Pesquisa adotados, evidenciaram grau de confirmação bioquímica e imunológica da ordem de 67% e 84%, respectivamente, quando do emprego dos meios sólidos seletivos *SMAC*-MUG e *SMAC*-CT.

Confirmam-se assim, mais uma vez, os melhores resultados do ágar *SMAC*-CT, muito embora neste estudo de confirmação bioquímica e imunológica não tenham sido aferidos, o que já foi anteriormente explicitado, critérios de natureza quantitativa.

De maneira geral, pode-se dizer que os nove testes bioquímicos então empregados, de acordo com recomendação da AOAC (1998), foram efetivos para a devida confirmação de *E.coli* O157:H7.

Já a utilização do ensaio imunológico que se baseou no emprego do teste de imunoaglutinação *E.coli* O157 *latex*, Oxoid, apresentou-se vantajosa no que diz respeito à redução do tempo de análise, cerca de sete dias.

Todavia, cautela em seu uso deve ser tomada, a saber pela possibilidade da presença de reação cruzada, aproximadamente 9%, o que ora se observou quando dos ensaios com as 256 amostras bacterianas de *E.coli* O157:H7.

4.2 Da otimização da técnica de *PCR multiplex*

O DNA extraído de *E.coli* O157:H7 apresentou valor de aproximadamente 40 ng/µL, obtido a partir da análise comparativa de intensidade de bandas do bacteriófago Lambda, este padronizado em 400 ng/µL, conforme se observa na Figura 4.

Uma vez tendo sido extraído e quantificado o DNA de *E.coli* O157:H7 e escolhidos os quatro pares de iniciadores para a amplificação de regiões específicas do microrganismo, quatro reações de *PCR* foram separadamente realizadas.

Os resultados obtidos confirmaram, para estas quatro reações, produtos de tamanhos já esperados: A e B ≅ 420 pb; C e D ≅ 614 pb; E e F≅ 450 pb e G e H ≅ 165 pb, de acordo com Gannon et al. (1992), Fagan et al. (1999), Maurer et al. (1999) e Holland et al. (2000) e conforme se observa na Tabela 6.

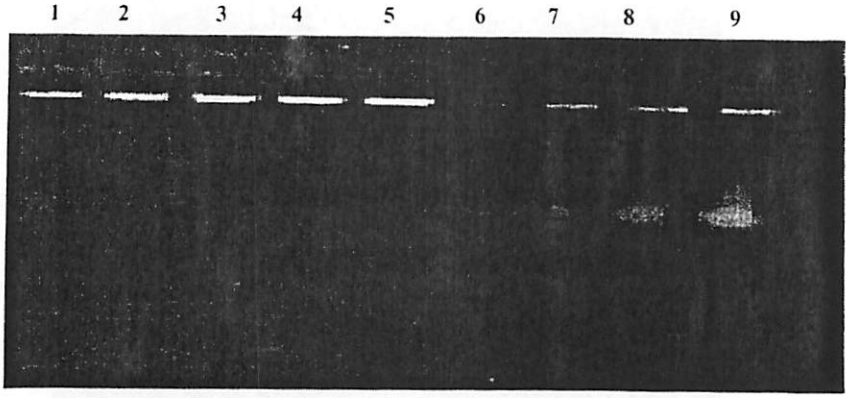

FIGURA 4 Avaliação comparativa de diferentes teores de DNA de *E.coli* O157:H7, frente ao DNA íntegro de bacteriófago Lambda
1: DNA íntegro de Lambda 50 ng; 2:DNA íntegro de Lambda 100 ng; 3: DNA íntegro de Lambda 200 ng; 4:DNA íntegro de Lambda 30 ng; 5: DNA íntegro de Lambda 400 ng; 6: DNA *E. coli* O157:H, ≅ 10 ng; 7: DNA *E. coli* O157:H7 ≅ 20 ng; 8: DNA *E.coli* O157:H7 ≅ 30 ng; 9: DNA *E. coli* O157:H7 ≅ 40 ng.

Quanto à otimização da reação de *PCR multiplex*, utilizando os quatro pares de iniciadores simultaneamente, verificou-se que a temperatura de anelamento a 56 ^{0}C e a concentração de cada iniciador a 25 pmol foram eficientes para a amplificação específica de cada uma das quatro regiões genômicas ao mesmo tempo, conforme se observa na Figura 5. Desta maneira e nestas condições, a técnica de *PCR multiplex* para a detecção da cepa padrão de *E.coli* O157:H7 pôde ser, então, padronizada.

No que se refere à extensão de uso desta reação é interessante salientar que os resultados obtidos para a amplificação das quatro regiões genômicas a partir da situação *Uso direto de DNA extraído*, usado como molde, foram semelhantes aos obtidos a partir das outras modalidades *Uso de crescimento*

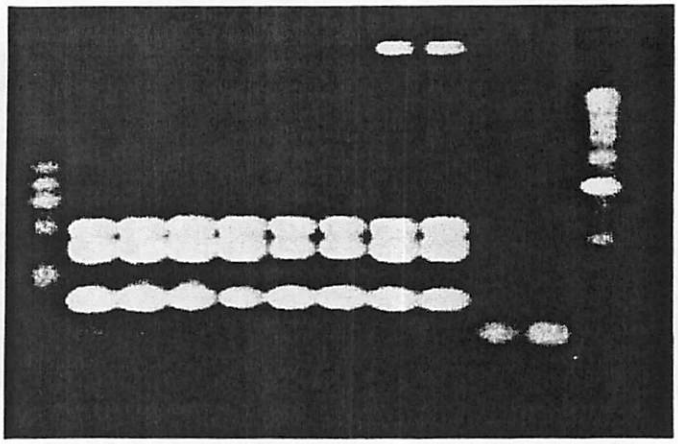

FIGURA 5 Eletroforese em gel de agarose, amplificação de quatro regiões distintas do DNA da cepa padrão de *E.coli* O157:H7 pela técnica de *PCR multiplex*

bacteriano em meio sólido, *Uso direto do crescimento bacteriano em meio líquido* e *Uso indireto do substrato alimentício*.

A aplicação da técnica da *PCR multiplex* empregando a situação *Uso indireto do substrato alimentício*, conforme testada para amostras de carne bovina moída previamente enriquecida a 37 °C, durante 24 h, permitiu a redução de tempo para o diagnóstico molecular da cepa padrão, em 29 h.

Este caso, em relação à situação *Uso direto de DNA extraído*, é da ordem de três dias, pela supressão de inúmeras etapas envolvidas quando da realização da metodologia analítica tradicional.

Já quando da utilização da modalidade *Uso direto do substrato alimentício líquido*, em que leite *in natura* inoculado com a cepa padrão *E.coli* O157:H7 foi pesquisado, não foi possível a detecção molecular do microrganismo, possivelmente devido à presença de inibidores da reação da *PCR multiplex* , inviabilizando-a. Pode-se propor, face a este resultado, o

emprego da situação *Uso indireto do substrato alimentício*, o qual prevê uma etapa única de pré-enriquecimento.

Quanto à especificidade da técnica de *PCR multiplex* não foi observado nenhum produto de amplificação para nenhuma das 11 amostras bacterianas testadas, ficando demonstrado que a técnica de *PCR multiplex* então padronizada neste experimento foi específica para a cepa padrão de *E.coli* O157:H7, conforme se observa na Figura 6.

A confirmação do grau de especificidade da técnica *PCR multiplex* voltada à detecção de *E.coli* O157:H7 já foi relatada por Gannon et al. (1992), Fratamico et al. (1995) e Kong et al. (1999).

Estes autores trabalharam com 28, 153 e 47 amostras bacterianas, respectivamente, dentre elas *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus equi, Salmonella Enteritidis, Streptococcus* sp, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, quando um máximo de até três pares de iniciadores, Vt_1, Vt_2 e *eae*A, foram utilizados.

4.2.1 Do Ensaio Piloto para avaliação da técnica de *PCR multiplex* - Detecção de *E.coli* O157:H7 em substratos alimentícios de origem bovina artificialmente inoculados com o microrganismo

Em se tratando das amostras de leite *in natura*, não foi possível a recuperação e detecção da cepa padrão inoculada, quando se adotou sua busca através da situação *Uso direto do substrato alimentício líquido*. A eventual presença de inibidores da reação de *PCR multiplex* neste substrato pode ter tornado esta técnica, neste caso, inconclusiva, sobre o que não há registros na literatura.

Resultados positivos foram obtidos a partir de amostras de carne bovina moída, em que *E.coli* O157:H7 pôde ser recuperada e detectada quando do emprego de pré-enriquecimento destas em caldo APT.

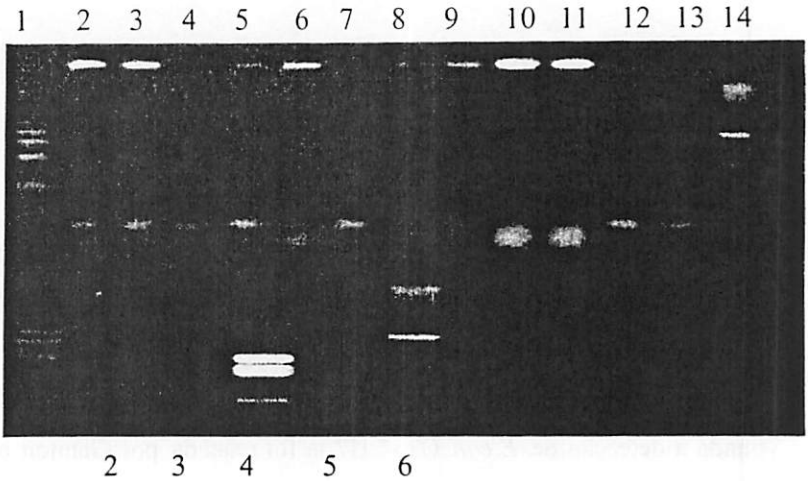

FIGURA 6 Especificidade da *PCR multiplex* para *E.coli* O157:H7 com ausência de amplificação em todas as outras amostras bacterianas

Gel superior:1: padrão λHindIII; 2: *B.cereus*; 3: *K. ozanae*; 4: *Enterobacter* sp.; 5: *L monocytogenes;* 6: *P. mirabilis*; 7: *P.aeruginosa*; 8: *R.eqüi*; 9: *S.Enteritidis*; 10: *S.*Typhi; 11:*S.Typhi*;12: *S. flexneri*; 13: *S. sonnei*;14:ϕ174HaeIII. Gel inferior:2:*S aureus*; 3: *Streptococcus* sp.; 4: *E.coli* O157:H7; 5: controle negativo; 6: ϕ174HaeIII

De acordo com a Figura 7, pode ser observada a amplificação das quatro regiões genômicas estudadas obtidas a partir da modalidade *Uso de crescimento bacteriano em meio sólido*. Neste ensaio, foram foto-documentadas 32 amostras bacterianas selecionadas dentre 256 colônias – crescimento em ágar *SMAC*-CT e *SMAC*-MUG procedentes dos substratos alimentícios artificialmente inoculados conforme Ensaio Piloto descrito no item 3.2.1.

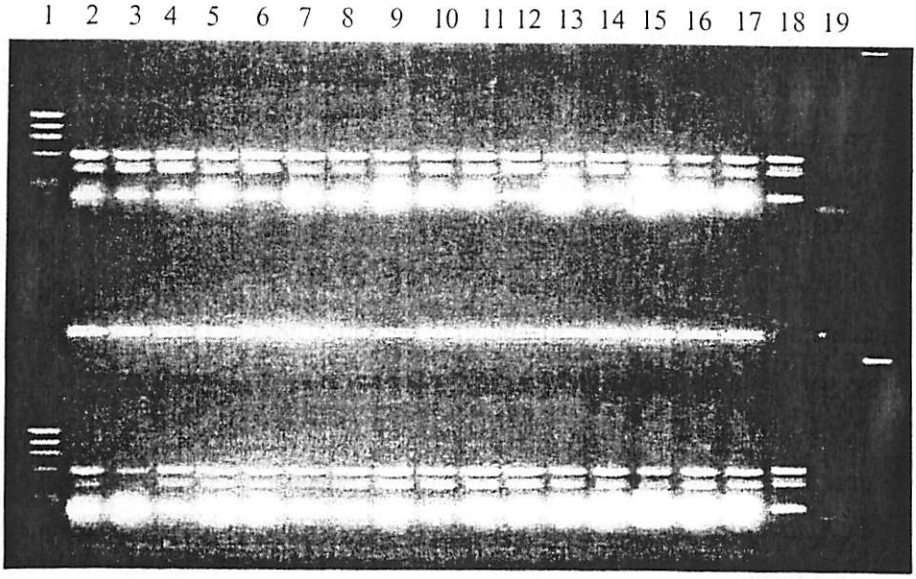

FIGURA 7 Perfil eletroforético de colônias de *E.coli* O157:H7 isoladas em meios sólidos seletivos.
1: padrão λ HindIII; 2 a 17 : colônias de *E. coli* O157:H7; 18: controle positivo; 19: controle negativo.

4.3 Da pesquisa de *E.coli* O157:H7 enquanto contaminante natural em material clínico e alimentos de origem bovina usando a metodologia analítica tradicional e a técnica de *PCR multiplex*

As 30 amostras de material fecal provenientes de fêmeas bovinas sadias e em fase de lactação mostraram-se negativas quanto à presença de *E.coli* O157:H7, quer seja utilizando a metodologia analítica tradicional ou pela técnica de *PCR multiplex*.

Estes resultados diferem daqueles apresentados por Trabulsi (1999) por meio dos quais se apontou uma positividade superior a 80% de *E.coli* enterhemorrágica no rebanho bovino brasileiro.

O grau de sensibilidade da técnica de *PCR multiplex*, conforme reportado por Gannon et al. (1998), é de 0,5 a 1,0 UFC/g ou mL do substrato

pesquisado. Sabe-se, todavia, segundo Holland et al. (2000), que, de acordo com o emprego da técnica de *PCR* multiplex, resultados falso-negativos para a presença do microrganismo podem ser observados quando pequeno volume de fezes for avaliado, o que ocorreu neste experimento.

Este mesmo dado corrobora os resultados negativos igualmente observados para a pesquisa de *E.*coli O157:H7 quando do estudo da contaminação natural de 30 amostras de carne bovina moída destinadas ao preparo industrial de hambúrguer.

Todas estas 30 amostras, testadas em triplicata, mostraram-se negativas, quer seja quando analisadas pela metodologia tradicional como pela técnica de *PCR multiplex*, esta última especialmente padronizada com este fim e para este experimento.

No Brasil, no período situado entre 1998 e 2001, pesquisa deste patógeno enquanto contaminante natural já foi realizada em diferentes alimentos como leite cru, leite pasteurizado, queijo tipo Minas, carne bovina moída e hambúrguer, não tendo sido evidenciada, em nenhum deles, a presença de *E.coli* O157:H7 (Marques, 1997; Manhani & Serrano, 1998; Marques & Landgraf, 1998; Franco & Landfgraf, 1999; Pereira et al., 1999; Viegas & Bechtel, 1999; Manhani, 2000).

5 CONCLUSÕES

De acordo com as condições empregadas neste experimento e os resultados apresentados e discutidos anteriormente, pôde-se concluir o que abaixo se transcreve:

- A recuperação de *E.coli* O157:H7 artificialmente inoculada em substratos alimentícios de origem bovina - leite *in natura* e carne moída - foi possível utilizando-se dois Protocolos de Pesquisa da metodologia analítica tradicional, com e sem pré-enriquecimento em APT.

- A recuperação de *E.coli* O157:H7 artificialmente inoculada em substratos alimentícios de origem bovina - leite pasteurizado tipo C - foi somente possível quando do emprego de Protocolo de Pesquisa da metodologia analítica tradicional que utilizou pré-enriquecimento em APT, o que não ocorreu na ausência deste.

- Os caldos seletivos *mTSB*+n e *mEC*+n apresentaram similar capacidade inibitória sobre a microbiota acompanhante, o que se comprovou com o posterior emprego dos meios sólidos seletivos, igualmente *SMAC*-MUG e *SMAC*-CT.

- O meio sólido seletivo *SMAC*-CT mostrou-se mais eficaz na recuperação e detecção de *E. coli* O157:H7 artificialmente inoculada.

- A técnica de *PCR multiplex* pôde ser otimizada com a temperatura de 56 °C para anelamento do DNA e concentração de 25 pmol para cada iniciador molecular, mostrando-se estas condições como ideais para a

amplificação das quatro regiões genômicas específicas à cepa padrão de *E.coli* O157:H7 - VT_1, EHEC-*hly*, *eae*A e O157.

- A utilização simultânea de quatro pares de iniciadores moleculares, VT_1, EHEC-*hly*, *eae*A e O157, personalizando a técnica de *PCR multiplex*, mostrou-se sensível e específica para a cepa padrão de *E.coli* O157:H7.

- Não foi evidenciada a contaminação natural de *E. coli* O157:H7 nos alimentos e material clínico pesquisados - 30 amostras de material fecal de fêmeas bovinas sadias, procendentes do CEDAF-UFV, e em fase de lactação e 30 amostras de carne bovina moída destinada ao preparo industrial de hambúrguer - tanto pela metodologia analítica tradicional como pela técnica de *PCR multiplex*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, M.; MAHON, B.; LEAHY, E. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumiption. In : INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTERAPY, 36., 1996, New Orleans. **Abstracts**... New Orleans: [s.n.], 1996.

ADAK, G.; SMITH, H.; WILLSHAW, G. A review outbreaks of vero Cytotoxin *Escherichia coli* O157 in England and Wales, 1992-1996. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 30., 1997, Baltimore. **Abstracts**... Baltimore: [s.n.], 1997. v.75/1, p.10.

AHMED, S.; CONNER, D. E. Evaluation of various media for recovery of termally-injuried *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 4, p. 357-360, Apr. 1995.

ALLEN, J. A.; SMITH, C. J. Enzyme-linked immunosorbent assay kits for routine food analysis. **Tibtech**, v. 5, p. 193-199, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. USA, 16. ed., [S.l.: s.n.], 1998. v.1.

BARREIROS, M. A. B. et al. Ocorrência decitotoxinas em *E. coli* isoladas de fezes de bezerros com diarréia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 17., 1993, Santos. **Resumos**... Santos: [s.n.], 1993.

BELL, B. P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P. M. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – Associated bloody diarrhea and hemolitic uremic syndrome from hamburgers. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 272, n. 17, p. 1349-1353, Nov. 1994.

BETTELHEIM, K. A. *Escherichia coli* O157 outbreak in Japan: lessons for Australia. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 75, n. 2, Feb. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológi cos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n.7-E, 10 jan. 2001.

BRIAN, M. I.; FROSOLOMO, M.; MURRAY, B. E.; MIRANDA, A.; LOPEZ, E. C.; GOMES, H. F.; CLEARY, T. G. Polymerase Chain Reaction for diagnosis of enterohemorragic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology,** Washington, v. 30, n. 7, p.1801-1806, July 1992.

CANDLISH, A. A. G. Immunobiological methods in food microbiology. **Food Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 1-4, Mar. 1991.

CARTER, A. O. et al. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7–associated hemorragic colites in a nursing home. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 317, n. 24, p. 1496-1500, Dec. 1987.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of Bacterial and Mycotic Diseases.*Escherichia coli* O157:H7.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli-t.htm>. Acesso em: 12 jul. 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7 - North Dakota, 1990. **Morbidity and Mortality Weekly Report,** Atlanta, v. 40, n. 16, p. 256-257, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgueres - Western United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, p. 258-263, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburguer - California, July 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 43, n. 12, p. 213-216, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary report *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercialy distributed dry-cured salame - Washington, California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 44, p. 157-160, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.Outbreak of *Escherichia coli*O157:H7 infection - Georgia and Tenessee. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 45, n. 12, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Escherichia coli* O157:H7:** Infections linked to consumption of a nationally distribuited, commercial brand of frozen ground beef patties - Colorado, 1997. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr0822.htm>. Acesso em: 15 jun. 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Public Health Dispatch: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of Washington county fair – New York. **Morbidity and Mortality Weekly Report,** Atlanta, v. 48, n. 36, 1999. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4836a4.htm>. Acesso em: 12 jul. 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of Bacterial and Mycotic Diseases *Escherichia coli* O157:H7.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli-t.htm>. Acesso em: 12 jul. 2000.

CERQUEIRA, A. M. F. et al. Características fenotípicas e perfil plasmidial de amostras de *E.coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas e produtos cárneos, fezes humanas e bovinas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos...** Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; NORMAN, P. Verocytotoxin – producing *Escherichia coli* infections in Sheffield: cattle as a possible source. **Epidemiology Infection,** New York, v. 102, n. 3, p. 439-445, June 1989.

CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A.; ZADIK, P. M.; JEWES, L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. **Journal Medical Microbiology,** Washington, v. 35, n. 2, p. 107-110, Aug. 1991.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; SIDDONS, C. A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E.coli* O157. **Food Control,** Oxford, v. 6, n. 4, p. 187-193, Aug. 1995a.

CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; SIDDONS, C. A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections. **British Food Journal,** Oxford, v. 97, n. 10, p. 29-31, Oct. 1995b.

CIESLAK, P. R.; BARRET, T. J.; GRIFFIN, P. M.; GENSHEIMER, K. F.; BECKETT, G.; SMITH, M. G. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. **Lancet**, London, v. 342, n. 8867, p. 367, Aug. 1993.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 10, p. 23394-2396, Oct. 1987.

DOYLE, M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. cap. 6, p. 234-273.

ENTANI, E. et al.Antibacterial action of vinager against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 (part 1). Examination of bacteriostatic and bactericidal activities. **Kansenshogaku Zasshi**, Kagoshima, v. 71, n. 5, p. 443-450, 1997.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. [S.l.]; Elsevier Science, 1986. p. 93-134.

FAGAN, P. K.; HORNITSKY, M. A.; BETTELHEIM. K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Detection of Shiga-like toxin (Stx1 and Stx2), Intimin (*eae* a), and Enterohemorragic *Escherichia coli* Hemolysin (EHEC *hly*) genes in animal feces by Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 868-872, Feb. 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. 181p.

FRATAMICO, P. M.; SACKITEY, S. K.; WILDMANN, M.; DENG, M. Y. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 8, p. 2188-2191, Aug. 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bad Bug Book. *Escherichia coli* O157: H7**. Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html>. Acesso em: 12 mar 1999.

FUKUSHIMA, H.; HASHIZUMET, T.; KITANI, T. The massive outbreak of enterohemorragic *E.coli* O157 infections by foods poisoning among the elemntary school childres in Sakai, Japan in 1996. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) PRODUCING *Escherichia coli* INFESTONS, 30., 1997, Baltimore. **Abstracts** ... Baltimore: [s.n.], 1997. v. 6/7, p. 111.

GANNON, V. P. J.; KING, R. K.; THOMAS, E. J. G. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. **Cannadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v. 52, n. 3, p. 331-337, 1988.

GANNON, V. P. J.; KING, R. K.; KIM, J. Y.; THOMAS, E. J. G. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the Polimerase Chain Reaction. **Applied Envirionmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 3809-3815, Dec. 1992.

GANNON, V. P. J.; SOUZA, S.; GRAHAM, T.; KING, R.K.; READ, S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorragic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 3, p. 656-662, Mar. 1997.

GATTI, M. S. V. et al. Virulence factors present in strains of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 21-30, 1985.

GERMANI, Y.; CUNIN, P.; TEDJOUKA, E.; NCHARRE, C. B.; MORVAN, J.; MARTIN, P. Enterohemorragic *Escherichia coli* in Ngoila (Cameroon) during an outbreak of bloody diarrhoea. **The Lancet**, London, v. 352, n. 9128, p. 625-626, Aug. 1998.

GIUGLIANO, L. G. et al.Caracterizaton of necrotizing *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic children in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 274-278, 1995a.

GIUGLIANO, L. G. et al. Virulence of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic children: influence of storage conditions. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 267-273, 1995b.

GLYNN, K.; CODY, S.; CAIRNS, L. International outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with unpasteurizaed commercial apple juice. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 30., 1997, Baltimore. **Abstracts**... Baltimore: [s.n.], 1997. v. 14/1, p. 18.

HEUVELINK, A. E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; BOER, E. Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 7, p. 817-824, July 1997.

HINKENS, J. C.; FAITH, N. G.; LORANG, T. D.; BAILEY, P.; BIREGE, D.; KASPAR, C. W. Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 12, p. 1260-1266, Dec. 1996.

HOLLAND, J. L.; LOUIE, L.; SIMOR, A. E.; LOUIE, M. PCR detection of *Escherichia coli* O157: H7 directly from stools: evaluation of commercial extration methods for purifying fecal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4108-4113, Nov. 2000.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R.; SNEAATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Eds). Groups within the four major categories of bacteria. In: _____. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 175,179-181.

INTERNACIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganisms in Foods**. 3. ed.Toronto, 1983.

ISAÄCSON, M. et al Haemorragic colites epidemic in Africa. **Lancet**, London, v. 341, p. 961, 1993.

JERSEK et al. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. **Letters and Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 55-60, Jun. 1996.

KARCH, H.; JANETZKIMITTMANN; C.; ALEKSIC, S.; DATZ, M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 stranis from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA based methods and direct culture. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 516-519, Mar. 1996.

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

KIM, M. S; DOYLE, M. P. Dipstick immnuassay to detect enterohemorragic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef. **Applied Environmetnal Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5,p. 1764-1767, May 1992.

KONG, R. Y. C.; SO, C. L.; LAW, W. F.; WU, R. S. S. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of Enterotoxigenic (ETEC), Enterohaemorragic (EHEC) and Enteropathogenic (EPEC) strains of

Escherichia coli. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 1207-1215, Dec. 1999.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enterophatogenic *E.coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiology Review**, Baltimore, v. 6, n. 1, p. 31-51, 1984.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 155, n. 3, p. 377-388, Mar. 1987.

LINGGOOD, M. A.; THOMPSON, J. M. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with edema disease. **Journal of Medical Microbiology**, Washington, v. 25, n. 4, p. 359-362, Dec. 1987.

LIOR, H. *Escherichia coli* O157 and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames,v. 17, n. 7, p. 378-382, July 1994.

MANHANI, M. R.; SERRANO, A. M. Avaliação de métodos de isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de leite cru e queijo tipo Minas frescal. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos**... Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

MANHANI, M. R. **Desempenho da metodologia para isolamento e contagem de *Escherichia coli* O157:H7 em leite e queijo e sua ocorrência em queijo Minas frescal produzido comercialmente**. 2000. 90p. Exame de Qualificação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARCH, S. B.; RATNAM, A. Sorbitol MacConkey medium for detection of *Escherichia* coliO157:H7 associated with hemorragic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, n. 5, p. 869-872, May 1986.

MARQUES, P. A. H. F. **Avaliação de metodologias para o isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 de carne bovina moída. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em hambúrgueres.** 1997. 89p. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARQUES,P. A. H. F.; LANDGRAF, M. Avaliação de metodologias para o Isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 de carne bovina moída. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em hambúrgueres. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos**... Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

MARTINEZ, A.; MARTÍN, M.; DÍAZ, R. Evaluacion de varias metodologias para la recuperacion de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de alimentos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS,5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos**... Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

MAURER, J. J.; SCHIMIDT, D.; PETROSKO, P.; SANCHES, S.; LEE, M. D. Development of primers to O-antige biosyntes genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2954-2960, July 1999.

McCLEERY, D. R.; ROWE, M. T. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. **Lettres in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 252-256, Oct. 1995.

McDANIEL. T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, Feb. 1995.

MEITRICH, L. H. et al. Prevalência de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en bovinos de la region pampeana Argentina. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS,5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos**... Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

MENG, J. H.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. H. Detection and Control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science &Technology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 170-185, June 1994.

MERMIN, J.H. et al.A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating mesclum mix lettuce. In : INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) PRODUCING *Escherichia coli* INFESTONS, 30., 1997, Baltimore. **Abstracts**... Baltimore: [s.n.], 1997. v. 14/1, p. 09.

MOBERG, L. J. ; WAGNER, M. K.; KELLEN, L. A. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods: Colllaborative study. **Journal Applied Association Official Analytical Chemistry**, Gaithersburg, v. 71, n. 3, p. 589-602, May/June 1988.

MORGAN, G. M.; NEWMAN, C.; PALMER, S. R.; ALLEN, J. B.; GROSS, R. J. First recognized community outbreak of hemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and Infection**, New York, v. 101, n. 1, p. 83-91, Aug. 1988.

MORGAN, G. M.; NEWMAN, C.; ALLEN, J. B.; SLEPHERD, W. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiology and Infection**, New York, v. 111, n. 2, p. 181-187, Oct. 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specifics synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzimology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.

NATARRO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherihia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Apr. 1998.

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHANG, T. W.; GORBACH, S. L. *Escherichia coli* O157 :H7 strains associated with hemorragic colitis in the United States produce a *Shigella desinteriae* 1 (Shiga)like cytotoxin **Lancet**, London, v. 146, n. 8349, p. 763-769, 1983.

O'BRIEN, A. D.; MELTON, A. R.; SCHIMITT, C. K.; McKEE, M. L.; GRIFFIN, D. E. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger- borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 10, p. 2799- 2801, Oct. 1993.

OKREND, A. J. G. A screening methods for isolation of *Escherichia coli* O157 :H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 3, p. 249-252, Mar. 1990a.

OKREND, A. J. G. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucoronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 11, p. 941-943, Nov. 1990b.

PAI, C. K.; GORDON, R.; SIMS, H. V. BRYAN, L. E. Sporadic cases of hemorragic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. **Annual International Medicine**, v. 101, p. 738-742, 1984.

PADHYE, N. V., DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n. 7, p. 555-565, July 1994.

PALUMBO, S. A.; CALL, J. E.; SHULTZ, F. J. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorragic Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 4, p. 352-356, 1995.

PATON, A. W., PATON, J. C. Detection and carcterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays fos Stx1, Stx2, *eae*A, enterohemorragic*E.coli*hlyA, *rfb* O111, *and rfb* O157.**Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 598-602, 1998.

PEREIRA, M. L. et al. Queijo tipo Minas estocado a baixas temperaturas. VII - Recuperação de *Escherichia coli* e pesquisa de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Resumos**... Salvador: [s.n.], 1999.

PEREIRA, M. L.; LEITÃO, M. F. F. *Salmonella* e *Escherichia coli* em sucos de frutas e outros substratos ácidos – uma revisão sobre injúria bacteriana. **Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 67-80, Jun. 1989.

RAMOTAR, K.; WALDHART, B.; CHURCH, D.; LOWE, T. J. Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 519-524, Mar. 1995.

REILLY, W. J.; CARTER, F. T. Surveillance of *E. coli* O157 in Scotland. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) PRODUCING *Escherichia coli* INFECTONS, 30., 1997, Baltimore. **Abstracts**...Baltimore: [s.n.]. v. 128/1, p. 16.

RICE, E. Drinking water associated with waterborne disease: hemorragic colites. **Dairy Food Environmental Sanitation**, Ames, v. 13, n. 10, p. 603, Oct. 1993.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; WELLS, J. G.; HEBERT, R. J.; COHEN, M. L. Hemorragic colitis assiciated with a rare *Escherichia* coli sorotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

SAAD, S.M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Influence of raw meat natural background flora on growth of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 30, p. 272-277, 1999.

SHARMA, V. K., DEAN-NYSTROM, E. A.; CASEY, T. A. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli O157:H7*and other shiga toxigenis *E.coli*. **Mollecular and Cellular Probes**, London, v. 13, n. 4, p. 291-302, Sept.1999.

SHARP, J. C. M. *Escherichia coli* O157 infections: the Scottish experience. **Hospital Medicine**, Feb. 1998.

SAMADPOUR, M.; OUGERTH, J. E.; LISTON, J.; TRAN, N.; WILSON, R. A. Occurence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh saafood, lamb, pork, and poutry from grocery stores in Seattle, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 1038-1040, Mar. 1994.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; HANCOCK, D. D. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2616-2619, Oct. 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: [s.n.], 1997.

SILVA, N. et al. Comparação de métodos de detecção de *E.coli* O157:H7 em alimentos. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóias. **Resumos**... Águas de Lindóias: [s.n.], 1998.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROBERTS, D. Examination of retail chickens and sausages in Britaisn for verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 7, p. 2091-2093, July 1991.

SU, C.; BRANT, L. J. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. **Annual International Medicine**, London, v. 123, n. 9, p. 698-714, 1995.

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

SWERDLOW, D. L. et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated withbloody diarrhea and death. **Annual Internacional Medicine**, London, v. 117, p. 812-819, 1992.

TARR, P. I. *E.coli* O157:H7 outbreak in the western United States. **Dairy,Food and Environmental Sanitation**,Ames, v. 13, n. 10, p. 592, Oct. 1993.

TAYER, D. W.; BOYD, G. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.4, p.1030-1040, Apr.1993.

TAYLOR, D. N.; ESCHEVERRIA, P. **Rev. Infect. Dis.** , Supplem. 2, p. 136-141, 1986.

TRABULSI, L. R. Bactéria encontrada no hambúrguer pode ser mortal. **Agência USP de Notícias:** 5 Abr. 1999, n. 389-399. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/arqweb.htm> Acesso em: 23 jul 2000.

TSEN, H. Y.; JIAN, L. Z. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stabile toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. **Journal and Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 585-592, Apr. 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE. ***Escherichia coli* O157:H7**: issues and ramifications. USA, 1994.

VANDERZANT , C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium for the microbiological examination of foods. APHA – American Public Health Association. 3. ed. Washington: [s.n.], 1992.

VIEGAS, C. V.; BECHTEL, M. A. B. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em hambúrguer cru comercializado em Porto Alegre. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., 1999, Campinas. **Resumos**...Campinas: [s.n.], 1999.

WATERS, J. R.; SHARP, J. C. M.; DEV, V. J. Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada and in Scotland: A fivy-ear review 1987-1991. **Clinical Infected Disease**, Chicago, v. 19, n. 5, p. 834-843, Nov. 1994.

WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; BARK, D. H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 7, p. 629-631, July 1994.

WEAGANT, S. D.; BRYANT, J . L.; JINNEMAN, K. G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 1, p. 7-12 , Jan. 1995.

WEAVER, J. W., ROWE, M.T. Effect of non-target cells on the sensitivity of the PCR for *Escherichia* coli O157:H7. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 109-112, 1997.

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMITH, I. K. Laboratory investigation of hemorragic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal Clinical Microbiology, Washington,** v. 18, n. 3, p. 512-520, 1983 .

WUETRICH, B. Back on the farm: stopping *Escherichia coli* O157:H7 at its source. **ASM News**, Michigan, v. 60, n. 8, p. 409, 1994.

ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal Medical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 155-158, Feb. 1993.

ANEXOS

ANEXO A

Página

ANEXO B

Página

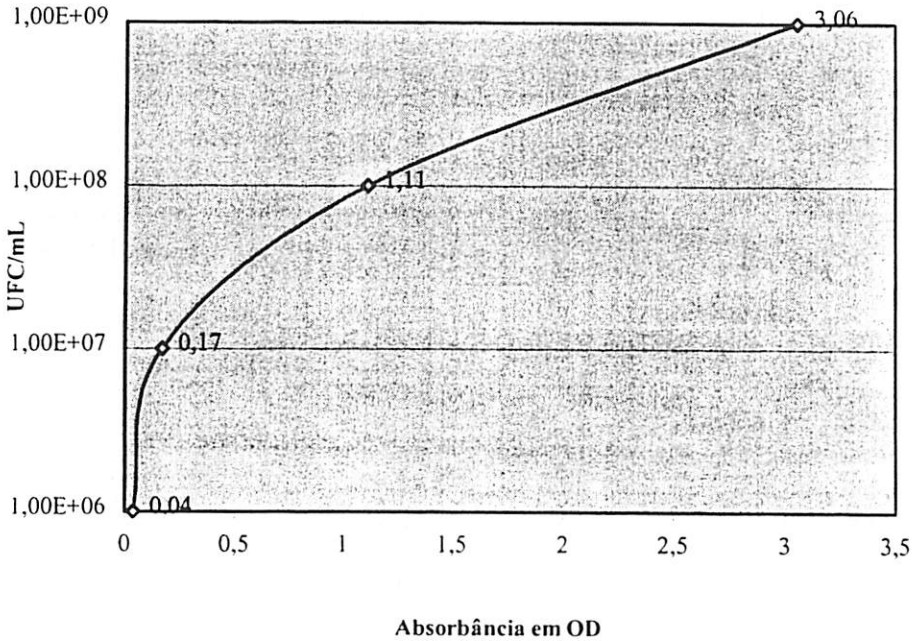

FIGURA A Curva de crescimento da cepa padrão de *E.coli* O157:H7

Ágar seletivo SMAC-CT, de acordo com Zadik et al (1993)

Preparar o ágar MacConkey Sorbitol, *SMAC*, Oxoid, de acordo com as especificações do fabricante. Após autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar atingir a temperatura de aproximadamente 45°C e acrescentar 4mL da solução cefixima-telurito para cada litro de meio.

Ágar seletivo SMAC-MUG, de acordo com March &Ratnam (1986)

Preparar o ágar MacConkey Sorbitol, *SMAC*, Oxoid, de acordo com as especificações do fabricante, acrescentar 4mL do reativo MUG, Oxoid, preparado conforme fabricante, para cada litro de meio. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Caldo seletivo mEC+n, de acordo com Okrend et al (1990a)

Água destilada	1000mL
Fosfato de potássio, Oxoid	1,5g
Sal de bile # 3, Merck	1,5g
Triptona, Biobrás	20,0g
pH final de 7,4	

Autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar atingir a temperatura ambiente e acrescentar 5mL da solução de novobiocina, distribuir em frascos esterilizados.

Caldo seletivo mTSB+n, segundo Doyle & Schoeni (1987)

Água destilada	1000mL
Cloreto de sódio,	5,00g
Fosfato de potássio (KH_2PO_4), Oxoid	1,50g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4), Oxoid	4,00g
Lactose, Difco	5,00g
Sal de bile # 3, Merck	1,12g
Triptona, Biobrás	20,00g
pH final de 6,9	

Autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar atingir a temperatura ambiente e acrescentar 5mL da solução de novobiocina, distribuir em frascos esterilizados.

Solução cefixima-telurito

Água destilada autoclavada	4,00mL
Cefixima	0,05mg
Telurito	2,50mg

Filtrar a solução assepticamente, acondicionar em frasco âmbar a temperatura de 8°C.

Solução de novobiocina

Água destilada autoclavada	1000mL
Novobiocina	20mg

Filtrar a solução assepticamente, acondicionar em frasco âmbar em freezer.