Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos

FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO E PROPRIEDADES DE
Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA EM ALIMENTOS

BERNADETTE DÓRA GOMBOSSY DE MELO FRANCO

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. LUIZ RACHID TRABULSI

São Paulo
1983

10722

ao meu marido Antonio Carlos
às minhas filhas Nancy e Cristina

ã minha mãe

ao meu falecido pai

Este trabalho foi realizado no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e na disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, com auxílio financeiro da FINEP (Financiadora de Estudo e Projetos).

Agradecimentos

A autora deseja expressar sua gratidão a todos aqueles que colaboraram na execução desta tese. Assim:

ao Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi
ã Prof. Beatriz E. C. Guth
ã Srta. Dilma Scalla Gelli
ã Prof. Dra. Maria Regina Fernandes de Toledo
ao Prof. Dr. Franco Maria Lajolo
ao Prof. João Luiz Hoefel
ã Srta. Valéria Brito de Oliveira
ã Sra. Adélia Peres Rabelo
ã Srta. Carmem Helena Moreno de Azevedo
ã Sra. Denise de Toledo Podobby da Cruz
ã Seção de Microbiologia Alimentar no Instituto Adolfo Lutz
ao Departamento de Agronomia do CEAGESP
aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Ali-
mentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da USP e da disciplina de Microbiologia do
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
da Escola Paulista de Medicina.
ã FINEP

ÍNDICE

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	
1.1 - <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	1
1.2 - <i>E. coli</i> invasora (EIEC)	7
1.3 - <i>E. coli</i> patogênica clássica (EPEC)	9
1.4 - <i>E. coli</i> como patógeno veiculado por alimentos..	11
2 - MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 - Amostras de alimentos	20
2.2 - Isolamento de <i>E. coli</i>	21
2.3 - Sorotipagem para pesquisa de EPEC	25
2.4 - Sorotipagem para pesquisa de EIEC	25
2.5 - Teste para produção de enterotoxina ST	26
2.6 - Teste para produção de enterotoxina LT	27
2.7 - Pesquisa do antígeno O das amostras de ETEC ...	28
2.8 - Pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/ /II	29
2.9 - Teste de sensibilidade a drogas	30
2.10 - Caracterização bioquímica	31
2.11 - Meios de cultura e soluções	32
3 - RESULTADOS	
3.1 - Isolamento de amostras de EPEC	38
3.2 - Isolamento de amostras de EIEC	40

	pág.
3,3 - Isolamento de amostras de ETEC	40
3.4 - Pesquisa do antígeno O das amostras de ETEC	40
3.5 - Pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II	41
3.6 - Teste de sensibilidade a drogas	41
3.7 - Caracterização bioquímica	42
 4 - DISCUSSÃO	 50
 5 - CONCLUSÕES	 60
 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 63
 RESUMO	 79
 SUMMARY	 81

1 - INTRODUÇÃO

① Em consequência à frequente precariedade das condições higiênico-sanitárias de produção de alimentos, é comum neles observar-se a presença de coliformes, inclusive Escherichia coli. Além da gravidade da constatação de que o alimento está contaminado com microrganismos de origem fecal, a presença de E. coli pode ter um significado particularmente importante, uma vez que existem linhagens que são enteropatogênicas para o homem e para animais.

② As patogenias de E. coli podem ser expressas por mecanismos diversos. Assim, conhece-se a E. coli enterotoxigênica - (ETEC), produtora de toxinas que agem a nível de intestino delgado provocando eliminação abundante de água e eletrólitos, a E. coli invasora (EIEC), que invade a mucosa intestinal determinando diarreia semelhante à provocada por Shigella, e a E. coli enteropatogênica clássica (EPEC), ativa, aparentemente, somente em crianças até o primeiro ano de vida, com mecanismo de virulência ainda não esclarecido completamente.

1.1 - E. coli enterotoxigênica (ETEC)

Os conhecimentos atuais sobre ETEC tiveram início com o desenvolvimento do modelo experimental de DE e CHATTERJE⁽¹³⁾ pa

ra estudo da patogenia da cólera, em 1953. Em 1956, DE e cols.⁽¹²⁾ empregaram este modelo para estudar amostras de E. coli isoladas de adultos normais e diarrêicos, demonstrando que as amostras isoladas de diarréia determinaram efeito semelhante ao do vibrião cólérico em alças ligadas de intestino de coelho, o mesmo só acontecendo raramente em amostras isoladas de indivíduos sem sintomatologia gastrointestinal.

A partir de 1967, com os trabalhos de SMITH e HALLS⁽¹⁰⁶⁾, GYLES e BARNUM⁽⁴⁶⁾, SMITH e GYLES⁽¹⁰⁵⁾ e SACK e cols.⁽⁹⁵⁾, ficou confirmado definitivamente que sobrenadantes ou lisados estêreis de vários tipos sorológicos de E. coli, de origem animal ou humana, determinavam transudação de líquido para as alças intestinais de coelhos e outros animais. As substâncias responsáveis foram denominadas enterotoxinas, e surgiu, então, o conceito de E. coli enterotoxigênica, responsável por diarréia no homem, adulto ou criança, e em várias espécies animais.

Os estudos a respeito das ETEC avançaram bastante na última década. Assim, sabe-se que há, pelo menos, 2 tipos de enterotoxina: uma termolábil, denominada LT e outra termoestável, denominada ST.

A enterotoxina LT é, sob vários aspectos, bastante semelhante à toxina colérica, produzida pelo Vibrio cholerae. Trata-se de uma proteína antigênica, de peso molecular ao redor de 100.000 daltons, formada por uma subunidade A e 5 subunidades B. Sua ação ocorre a nível de intestino delgado, sendo que a subunidade B promove a fixação da molécula à mucosa intestinal, através de receptores gangliosídicos GM₁ aí existentes. A subunidade A, uma vez dentro do enterócito, promove a estimulação da adenilci -

clase, provocando um acúmulo de AMP cíclico, responsável pela alteração no metabolismo hidrosalino da mucosa. O AMP cíclico estimula a secreção de NaCl e de bicarbonato a nível de cripta, e bloqueia a absorção de NaCl a nível de vilosidade intestinal (6,7,22,45,50,58,87,95,116).

A enterotoxina ST, por outro lado, é um peptídeo de baixo peso molecular, de 1000 a 10000 daltons, não imunogênica, cujo mecanismo de ação, embora não perfeitamente esclarecido, parece ser a indução de aumento nos níveis de GMP cíclico das células do epitélio intestinal (54,56,84). Recentemente, foram descritas duas formas de enterotoxina ST (ST_a e ST_b) em E. coli enteropatogênica para porcos, com propriedades químicas e biológicas diferentes (5).

As amostras enterotoxigênicas, além da capacidade de produzirem toxinas, precisam aderir-se à mucosa do intestino delgado e colonizá-lo para que o processo infeccioso se estabeleça. Esta adesão é mediada por fímbrias protéicas, denominadas fatores de colonização, que estão presentes na superfície bacteriana e que reconhecem receptores específicos, localizados na superfície da célula epitelial intestinal (37). Os fatores de colonização apresentam propriedades antigênicas diferentes entre si e conferem às bactérias especificidade em relação ao hospedeiro.

Atualmente, são conhecidos os fatores de colonização K88, K99, 987P e F41, isolados de amostras de E. coli enterotoxigênica para animais (suínos, bovinos e ovinos) (81,83,86) e os fatores de colonização CFA/I e CFA/II, descritos em amostras enterotoxigênicas para o homem (24,27,28). Estes fatores de colonização caracterizam-se por causar aglutinação de determinados ti-

pos de eritrócitos, como os de cobaia, galinha, cavalo, carneiro e os humanos. Esta hemaglutinação é manose resistente, ao contrário da fímbria tipo I, presente em amostras não enterotoxigênicas, cuja hemaglutinação é inibida pela manose. A presença dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II é variável em função do fenótipo enterotoxigênico das amostras de E. coli. Assim, estes fatores já foram observados em amostras produtoras de LT e ST simultaneamente, ou apenas ST, porém ainda não foram descritos em amostras produtoras apenas de LT^(10,69,90,91).

Tem sido observada uma certa relação entre a capacidade de produção de enterotoxina e os antígenos O e/ou H das amostras de E. coli. ØRSKOV e cols.⁽⁸⁵⁾, estudando 106 amostras de ETEC isoladas em diversas regiões geográficas, tanto de crianças quanto de adultos, observaram a prevalência de determinadas combinações entre antígenos O e antígenos H, as quais foram raramente encontradas entre mais de 20.000 amostras de E. coli. Estes autores observaram certa frequência dos sorotipos 06:H16, 08:H9, 015:H11, 025:H42, 078:H11 e 078:H12. MERSON e cols.⁽⁸⁰⁾, analisando a relação entre sorotipo e fenótipo enterotoxigênico em 109 amostras de ETEC isoladas de pacientes com diarreia em Bangladesh, verificaram que 86% das amostras produtoras de LT e de ST simultaneamente pertenciam a apenas 4 sorogrupos: 06, 08, 078 e 0115. As amostras que produziam apenas ST pertenciam a 15 sorogrupos diferentes, sendo 078 e 0128 os mais comuns. Por outro lado, as amostras produtoras somente da toxina LT pertenciam, cada uma, a um sorogrupo diferente. Em um estudo realizado em S. Paulo, por REIS e cols.⁽⁹¹⁾, em 1980, verificou-se que todas as amostras produtoras apenas da toxina ST pertenciam ao sorogrupo 0128ac e estavam

distribuídas em 4 sorotipos diversos: 0128ac:H21, 0128ac:H12, 0128ac:H27 e 0128ac:H⁻. As amostras produtoras apenas da toxina LT pertenciam a vários sorogrupos, e as produtoras de ambas as toxinas pertenciam aos sorogrupos 06, 063 e 0139, com predominância dos sorotipos 06:H16, 063:H⁻ e 0139:H28. A relação entre sorotipo e enterotoxigenicidade foi estudada também por outros autores^(4,15,18), que também notaram a predominância de determinados sorotipos entre as amostras de ETEC produtoras de ST e as produtoras de LT e ST simultaneamente.

Existem marcadas diferenças na incidência de ETEC de acordo com a distribuição geográfica. Este patógeno, causa comum de diarreia nos países em desenvolvimento como Bangladesh, Brasil, Índia, Quênia, México, Marrocos, Peru, é pouco frequente no mundo desenvolvido, exceto em áreas de precárias condições higiênic-sanitárias⁽¹²⁰⁾. Parece também haver diferenças geográficas no tipo de enterotoxina produzida pelas amostras. Por exemplo, no México e Marrocos há predominância de amostras produtoras das toxinas LT e ST, no Quênia amostras produtoras de LT são mais frequentes, enquanto em Bangladesh as produtoras de ST são mais comuns que as demais.

Os métodos utilizados para investigação da capacidade enterotoxigênica de E. coli são vários, incluindo modelos animais, testes em linhagens celulares, e testes imunológicos.

Os modelos animais incluem o método clássico usado por TRABULSI⁽¹¹⁵⁾, no qual se inocula filtrados de culturas bacterianas em alças ligadas de intestino de coelho, em cujo lúmen a toxina LT provoca acúmulo de fluido, e o teste da permeabilidade vascular⁽²⁵⁾, baseado na inoculação intradérmica de sobrenadantes da

cultura bacteriana e consequente alteração da permeabilidade vascular local devido à ação da enterotoxina LT.

Posteriormente, foram desenvolvidos testes que detectam a toxina LT presente em sobrenadante de culturas de E. coli devido à sua atividade biológica em linhagens celulares especiais, como as células tumorais de adrenal de camundongos (células Y-1)⁽¹⁷⁾, as células de ovário de hamster chinês (células CHO)⁽⁴³⁾ e as células de rim de macaco africano (células VERO)⁽¹⁰⁹⁾. Estas células alteram-se morfológicamente sob a ação da toxina LT.

A purificação da enterotoxina LT e o reconhecimento de sua identidade imunológica parcial com a toxina colérica possibilitaram o desenvolvimento de testes imunológicos para a detecção desta toxina⁽¹⁰⁸⁾. Assim, EVANS e EVANS⁽²³⁾ desenvolveram o teste de imunohemólise passiva, posteriormente modificada por SERAFIM e cols.⁽¹⁰²⁾, que é uma reação de fixação de complemento. Posteriormente, foram propostas as técnicas de radioimunoensaio⁽⁴²⁾ e o teste imunoenzimático⁽¹²¹⁾. Recentemente foi desenvolvido o teste de BIKEN⁽⁵³⁾, onde a enterotoxina é detectada por imunodifusão em placa.

Com relação à enterotoxina ST, o teste inicialmente utilizado para sua detecção foi o da alça ligada de intestino de coelho, com leitura de 6h após a inoculação⁽²⁶⁾. Atualmente, o método padrão para seu estudo é o proposto por DEAN e cols.⁽¹⁴⁾, no qual se faz a inoculação intragástrica de sobrenadantes bacterianos em camundongos recém-nascidos e posterior cálculo da relação entre os pesos do intestino e da carcaça dos animais.

Ensaio em cultura de células não têm sido empregados para estudo da toxina ST, uma vez que não se conhece nenhuma linhagem celular sensível.

Os testes imunológicos, apesar da toxina ST não ter atividade imunogênica, tiveram um avanço quando a toxina purificada foi acoplada a um hapteno que lhe conferiu imunogenicidade^(39,60). Um antisoro foi preparado⁽³⁶⁾ e um teste de radioimunoensaio de boa sensibilidade pôde ser desenvolvido^(36,39).

Recentemente, MOSELEY e cols.⁽⁸²⁾ desenvolveram uma técnica para pesquisar os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas ST e LT, ao invés das toxinas propriamente ditas. Esta técnica utiliza fragmentos de DNA fita simples marcados com ³²P (sondas) responsáveis pela produção das toxinas ST e LT, que formarão híbridos específicos entre sequências de DNA homólogos, que devem estar presentes nas amostras enterotoxigênicas. Estes híbridos, radioativos, podem ser identificados pela exposição a um filme de Raios X.

A produção das toxinas LT e ST, bem como dos fatores de colonização, é codificada por plasmídios^(28,48,86,107). As amostras de ETEC produzirão ST, LT, ou ambas toxinas, dependendo do plasmídio que apresentam. A estabilidade destes plasmídios pode variar, cuja consequência pode ser a perda da capacidade enterotoxigênica após algum período de estocagem, ou mesmo, após vários repiques laboratoriais.

1.2 - E. coli invasora (EIEC)

Neste grupo estão incluídos determinados sorogrupos de E. coli que tem a capacidade de invadir a mucosa intestinal humana determinando diarreia semelhante à provocada por Shigella. São

consideradas invasoras as E. coli que possuem os seguintes antígenos: 028ac; 029, 042, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167^(114,116). Seu mecanismo de virulência vem sendo estudado desde 1965, com os trabalhos de SAKAZAKI e cols.⁽⁹⁸⁾ e TRABULSI^(115, 117, 118). A E. coli invasora penetra no organismo por via oral, provocando infecção no íleo terminal e intestino grosso. A bactéria penetra na célula epitelial intestinal, prolifera no seu interior, destruindo-a, e provoca uma reação inflamatória na mucosa. O paciente pode apresentar desde uma diarreia leve até uma síndrome disenterica grave.

A primeira alteração no hospedeiro é a destruição do bordo em escova do epitélio intestinal, com posterior invaginação da membrana celular e englobamento da célula bacteriana. Uma fração lipopolissacarídica parece estar envolvida na penetração e multiplicação no interior da célula epitelial⁽³³⁾.

O teste biológico clássico usado para estudo destas amostras invasoras é o teste de SERÉNY⁽¹⁰³⁾, que consiste na inoculação de suspensões bacterianas em olhos de cobaias albinos. O aparecimento de conjuntivite ou ceratite nos animais indica a penetração e a multiplicação bacteriana, respectivamente, nas células epiteliais da conjuntiva e da córnea. Posteriormente, OGAWA e cols.⁽¹¹⁴⁾ empregaram cultura de células HeLa, originárias de adenoma de colo uterino humano, para testar a capacidade invasora de E. coli.

As E. coli invasoras apresentam algumas propriedades bioquímicas que lhe são particulares, correspondendo, na realidade, a biosorotipos especiais dentro das E. coli. Assim, com exceção do sorogrupo 0124, são todas imóveis (não possuem, portanto, anti

geno H), e nenhuma delas é capaz de descarboxilar a lisina⁽¹⁰⁴⁾. Os antígenos O de várias E. coli invasoras são idênticos ou relacionados aos antígenos O de sorotipos de Shigella⁽¹¹⁶⁾.

1.3 - E. coli enteropatogênica clássica (EPEC)

Os estudos a respeito das E. coli enteropatogênicas clássicas tiveram início em 1945, quando BRAY⁽³⁾ demonstrou que um determinado sorotipo de E. coli foi responsável por uma epidemia de diarreia infantil em um hospital em Londres. Posteriormente, outros autores^(47,105,110) chegaram a resultados que sempre envolviam sorotipos determinados de E. coli como agentes de diarreia infantil. Com o surgimento do sistema de sorotipagem de KAUFFMANN⁽⁵⁹⁾, as amostras de E. coli responsáveis por aquelas síndromes puderam ser sorotipadas, sendo caracterizados os sorogrupos 055 e 0111.

Posteriormente, novos sorogrupos enteropatogênicos foram descritos, sendo, hoje, considerados EPEC os sorogrupos 026, 055, 086, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128, 0142 e 0158⁽¹¹⁶⁾. De modo geral, admite-se que estes sorogrupos de E. coli sejam patogênicos apenas para crianças em seu primeiro ano de vida, apesar de alguns trabalhos^(30,68) sugerirem que os distúrbios podem ocorrer mesmo em adultos.

A prevalência de determinado sorogrupo como causador de gastroenterite infantil parece variar em função da localização geográfica. Em nosso meio predominam as infecções provocadas pelos sorogrupos 0111 e 0119^(20,116).

Tem havido bastante controvérsia a respeito do mecanismo pelos quais estas amostras manifestam sua virulência. Em 1979, CRAVIOTTO e cols.⁽⁹⁾ constataram a presença de um fator de adesão, detectável em células HEp-2 (originárias de carcinoma de laringe humana), na grande maioria das amostras de E. coli pertencentes aos sorogrupos de EPEC causadores de diarreia. A capacidade de adesão foi posteriormente confirmada em outras linhagens celulares, como células HeLa e células de mucosa intestinal⁽⁷⁴⁾. Estudos histológicos⁽²⁰⁾ mostram lesão de célula intestinal associada a colonização por EPEC, com destruição do bordo em escova e alteração morfo-fisiológica de célula epitelial à qual EPEC está aderida. Por microscopia eletrônica, demonstra-se dissolução do glicocalix e achatamento de microvilosidades das células às quais EPEC aderiu. Biopsia de jejuno⁽²⁰⁾ mostra atrofia das vilosidades e desarranjo dos enterócitos.

Outros estudos demonstraram a presença de toxinas, como a verotoxina⁽⁶³⁾, ativa em células VERO, e a toxina de KLIPSTEIN^(61,62), demonstrável através de perfusão de intestino de ratos, detectados em vários sorogrupos causadores de diarreia endêmica infantil.

Recentemente, em estudos de genética molecular, BALDINI⁽²⁰⁾ demonstrou a presença de um plasmídio na quase totalidade das amostras de EPEC testadas, aparentemente responsável pela adesão em células HEp-2.

Por enquanto, a identificação das amostras de EPEC é feita exclusivamente por sorologia, segundo técnica de EDWARDS e EWING⁽²¹⁾.

1.4 - Escherichia coli como patógeno veiculado por alimentos

A suspeita de que a ingestão de água e alimentos contaminados pode ser a causa de surtos de diarreia data de 1903, quando DELEPINE⁽¹⁶⁾ pôde associar leite e produtos cárneos contendo bactérias do grupo Bacillus coli como possíveis causas de vários surtos de enterites nos EEUU. A suspeita acentuou-se, quando em 1949, HOBBS e cols.⁽⁵²⁾ descreveram um surto de enterite provocado por uma bactéria denominada "paracolon 411", envolvendo um grande número de escolares. Esta bactéria foi isolada na grande maioria das crianças que consumiram salmão em uma das refeições. Os autores envolveram este alimento como veículo do microrganismo patogênico, embora os exames bacteriológicos nele realizados não permitissem o isolamento da bactéria patogênica em questão. Posteriormente, esta bactéria foi identificada como sendo um Escherichia coli invasora do sorogrupo 0124⁽⁶⁵⁾.

E. coli 0124 provocou diversos surtos de gastroenterite na Hungria, no período entre 1957-1959⁽⁶⁵⁾ atingindo um grande número de pessoas, inclusive crianças. Estes surtos pareciam ser provocados pelo consumo de água contaminada com material fecal, da qual foi possível isolar, em alguns casos, E. coli 0124. Infelizmente, os exames bacteriológicos das fezes de indivíduos atingidos não permitiram o isolamento destes microrganismo.

Em 1964, COSTIN e cols.⁽⁸⁾ descreveram, na Romênia, um surto provocado por E. coli presente em grande quantidade em uma bebida substitutiva de café. E. coli do sorotipo 086:B7:H34 foi isolado tanto do alimento incriminado quanto das fezes dos escolares envolvidos neste surto.

Em 1966, descreveu-se na Suécia⁽⁷⁵⁾ um outro surto provocado por água contaminada com E. coli enteropatogênica dos sorotipos 0111:B4, 026:B6 e 0128:B12, isolados também dos doentes (adultos e crianças).

O sorotipo 0111:B4 foi também o causador do primeiro surto de gastroenterite via alimentar descrito na América Latina. Em 1965, MANZULLO e ESTEVEZ⁽⁷¹⁾, na Argentina, caracterizaram uma epidemia de diarreia em crianças, de cujas fezes se isolou E. coli 0111:B4 como único patógeno. Um levantamento realizado entre os fornecedores de leite das cercanias do local onde o surto se estabeleceu permitiu identificar um manipulador portador deste microrganismo, que contaminava as amostras de leite e creme produzidos. Como consequência, 70% das amostras de leite e de creme analisados estavam contaminados com E. coli 0111:B4.

E. coli 0111:B4 foi também o agente etiológico causador do surto de gastroenterite provocado pela água de abastecimento de um centro de conferências, em Washington, em 1967⁽¹⁰¹⁾. A água, não clorada, proveniente de um poço, continha E. coli 0111:B4, bem como as fezes das pessoas que haviam consumido a água, quer tivessem apresentado diarreia ou não. Curiosamente, neste surto (bem como naquele ocorrido na Romenia) foram envolvidos principalmente adultos.

Em 1971, ocorreu nos EEUU um surto de gastroenterite que atingiu centenas de consumidores, alcançando grande notoriedade. O alimento envolvido foi queijo Camembert importado da França. Segundo resultados obtidos por vários pesquisadores^(1,72,100), E. coli 0124 foi o único patógeno isolado das fezes das pessoas envolvidas no surto, e foi o sorogrupo mais frequentemente isolado de

diversas amostras de queijo recolhidas no país. Posteriormente, E.coli 0124 foi isolada também na fábrica que produzia o queijo, na França. Testes de invasão em olho de cobaia e de produção de enterotoxinas mostraram tratar-se de E. coli invasora, não enterotoxigênica. Algum tempo depois, PARK e cols.⁽⁸⁸⁾ analisaram, no Canadá, amostras de queijo Camembert da mesma fabricação daquela causadora do surto nos EEUU em 1971. Estes autores encontraram sorogrupos de E. coli diferentes: 018, 0128 e 0125, sendo que só o último deu resultado positivo no teste de Serény para E. coli invasora.

Em 1975, ocorreu o primeiro surto descrito de gastroenterite provocado por E. coli enterotoxigênica, veiculada pela água de um parque americano (Crater Lake National Park), envolvendo 2000 visitantes e 200 funcionários⁽⁹⁴⁾. ETEC 06:H16 foi isolada tanto das fezes de doentes quanto da água de abastecimento do parque. Amostras de água, aparentemente contaminadas com esgoto não tratado, apresentaram teores de cloro inferiores ao necessário. Estudos laboratoriais mostraram tratar-se de E. coli enterotoxigênica produtora das enterotoxinas LT e ST, e não invasora.

Mais recentemente, em 1979, foram descritos na Suécia, vários surtos de gastroenterite provocados pelo consumo de alimentos contaminados. Dos 12 surtos descritos por DANIELSON e cols.⁽¹¹⁾, 2 foram provocados por ETEC produtoras apenas da toxina LT. Um dos surtos foi devido ao consumo de salada de camarões e cogumelos, da qual foram isolados os sorotipos 025:H12, 022:H⁻ e 011:H4, todos ativos em células Y-1 e CHO. O outro surto foi devido ao consumo de rosbife, do qual foi isolado o sorotipo 08:H28, também ativo em células Y-1 e CHO.

Em janeiro de 1976, houve um surto de diarreia provocado por E. coli 025 produtora somente da enterotoxina LT, envolvendo 280 pessoas participantes de dois cruzeiros consecutivos no Caribe⁽⁷⁰⁾. A ETEC foi isolada das fezes de 83% das pessoas afetadas e de 40% das não afetadas. Esta alta frequência de isolamento entre pessoas sem sintomas foi associada a infecções subclínicas, que não desenvolveram a sintomatologia esperada. Embora não fossem feitas análises na água ou alimentos servidos durante os cruzeiros, houve associação estatística com o coquetel servido no jantar e com a água de abastecimento do barco.

Atualmente acredita-se que a E. coli enterotoxigênica seja o principal agente etiológico da chamada "diarreia do viajante"^(66,70,78). Esta síndrome afeta indivíduos que se locomovem de um país para outro, e tem sintomatologia bastante característica: diarreia aquosa aguda, acompanhada de náuseas, vômitos, dores abdominais, mal estar geral e febre. Os sintomas duram poucos dias, e na grande maioria dos casos, é uma doença autolimitada. Estudos de GORBACH e cols.⁽⁴¹⁾ e PICKERING e cols.⁽⁸⁹⁾, em 1975, mostraram que, aproximadamente 70% destas diarreias, ocorridas no México, estavam associadas à E. coli enterotoxigênica produtora da toxina LT. Outros estudos, realizados também no México⁽¹¹¹⁾, mostraram que a incidência desta síndrome foi mais elevada nos estudantes americanos vindos para um curso universitário de verão do que nos estudantes provenientes da América Central e do Sul (40% e 15%, respectivamente). O desenvolvimento da diarreia dos viajantes, nestes estudos, foi associado ao consumo de alimentos em vários restaurantes locais e na lanchonete da Universidade, uma vez que estudantes que se alimentaram em suas casas não haviam adqui-

rindo a doença. Além disso, os autores observavam altas contagens de E. coli naqueles alimentos. MERSON e cols.⁽⁷⁹⁾ também associaram infecção por ETEC com consumo de alimentos, mais especificamente vegetais crus, em pessoas viajando dos Estados Unidos para o México.

Parece não haver dúvidas de que linhagens patogênicas de E. coli veiculadas por água ou alimentos contaminados podem ser a causa de surtos de gastroenterites que atingem crianças e adultos em proporções e intensidade variadas. Apesar destas bactérias terem sido isoladas com relativa frequência de fezes de indivíduos diarreicos ou mesmo indivíduos assintomáticos, existem poucos dados epidemiológicos sobre a frequência destes microrganismos em água e alimentos^(64,75,76,77,93). O primeiro estudo encontrado na literatura data de 1967, quando HALL e cols.⁽⁴⁹⁾ examinaram 490 amostras de alimentos quanto à incidência de coliformes, inclusive E. coli. Os alimentos pertenciam à diversas categorias: carnes cruas, vegetais frescos e congelados, queijos, alimentos infantis, sobremesas congeladas, peixes e produtos marinhos, cereais, refeições preparadas e sanduiches. Todas as amostras de E. coli isoladas foram sorotipadas para pesquisas de EPEC. Os únicos resultados positivos obtidos foram duas cepas do sorotipo 026:B6 provenientes de carne bovina crua e de fígado de porco, e uma do sorotipo 055:B5 isolada de carne preparada e congelada.

VELAUDAPILLAI e cols.⁽¹¹⁹⁾, no Ceilão, encontraram apenas uma cepa de EPEC em 1809 amostras diferentes de frutas e vegetais, embora Salmonella e Shigella tivessem sido isoladas com alguma frequência. O sorotipo da EPEC isolada foi 026:K60, obtida de um tipo especial de banana.

Após a ocorrência do surto de gastroenterite por E. coli provocado pelo consumo de queijo Camembert importado, pesquisadores americanos passaram a observar a incidência de sorogrupos patogênicos de E. coli (incluindo EPEC e EIEC) neste tipo de alimento. FANTASIA e cols.⁽²⁹⁾ examinaram mais de 2000 amostras durante 2 anos, observando que 10% delas tinham algum sorogrupo de EPEC. A maioria das cepas patogênicas foram isoladas logo após o surgimento do surto de 1971, e pertenciam principalmente aos sorotipos 0124:B17, 0124:B15, 0112:B11, 0128:B12 e 0127:B8. Por outro lado, estudos desenvolvidos em vários tipos de queijos (Camembert, Brie, Muenster, Colby e outros) por FRANK e MARTH⁽³⁵⁾, num total de 106 amostras, não permitiram o isolamento de nenhuma amostra de EPEC, apesar da incidência de coliformes fecais observada ter sido bastante alta (17% das amostras tinham mais de 10.000 coliformes fecais/g).

Em nosso meio, raramente é feita a sorotipagem de E. coli isolada de alimentos para pesquisa daquelas pertencentes ao grupo das enteropatogênicas clássicas ou invasoras. Em 1979, GELLI e cols.⁽³⁸⁾, ao avaliar as condições higiênico-sanitárias de 125 amostras de hortaliças comercializadas em S. Paulo, isolaram uma cepa de EPEC de alface (sorotipo 0119:B14), 3 cepas a partir de escarola (2 do sorotipo 0127:B8 e uma 026:B6) e 1 cepa a partir de rúcula (sorotipo 0119:B4). FRANCO e HOEFEL⁽³⁴⁾ porém, não isolaram nenhuma cepa de EPEC em 68 amostras de alfaces investigadas.

A frequência com que amostras de E. coli enterotoxigênicas ocorrem nos alimentos foi estudada inicialmente por SACK e cols.⁽⁹⁷⁾, em 1977. Foram estudadas 240 cepas diferentes de E. coli, não pertencentes ao grupo das enteropatogênicas clássicas,

isoladas de alimentos de origem animal (queijos, hamburques, salichas e produtos marinhos). Observou-se que 8% das amostras de E. coli eram produtoras de enterotoxinas, conforme averiguado por testes em cultura de células Y-1, em alças ligadas de coelho e em camundongos recém-nascidos. Os sorotipos enterotoxigênicos mais frequentes foram 0149:H19 e 0149:H10, identificados entre as amostras de E. coli produtoras apenas da toxina LT.

Em 1978, ECHEVERRIA e cols.⁽¹⁹⁾ fizeram um levantamento sobre a incidência de ETEC em fezes de humanos e animais domésticos e em alimentos e água, em uma comunidade nas Filipinas. Estes autores não puderam isolar ETEC de nenhuma das 26 amostras de carne bovina, 25 de carne suína, 56 de vegetais e 47 de água contaminada, embora a tivessem isolado com razoável frequência nas amostras de fezes humanas e de animais.

GLATZ e BRUDVIG⁽⁴⁰⁾ também não obtiveram sucesso ao tentar isolar ETEC e EPEC de 68 amostras de queijo e 6 de leite cru, nos Estados Unidos. No leite cru estes autores puderam isolar algumas cepas de E. coli que aglutinavam com soros polivalentes para EPEC, porém, não fizeram a identificação dos sorogrupos envolvidos.

Incidência insignificante de ETEC em alimentos e água foi também observada por JIWA e cols.⁽⁵⁷⁾, na Suécia. Embora estes autores tivessem isolado um grande número de outras espécies bacterianas que eram positivas nos testes para enterotoxinas LT e ST, não observaram nenhuma E. coli produtora de toxina entre 213 amostras isoladas de alimentos (vegetais, carnes cruas e pescado cru), e apenas 2 ETEC produtoras somente de toxina LT em 36 amostras de água. As outras espécies bacterianas produtoras de toxi-

nas foram: Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus, Vibrio e outros. Nas 2 amostras de ETEC isoladas de água foi pesquisada também a presença de fatores de colonização, que foi negativa.

Em S. Paulo, REIS e cols.⁽⁹²⁾ estudaram 120 pacotes de alimentos processados de origem animal (hamburguer, salsicha, quibe) quanto à presença de ETEC. Das 1200 amostras de E. coli isoladas destes alimentos, 18 produziram LT, representando, respectivamente 5%, 7,5% e 10% dos pacotes de quibe, hamburguer e salsicha examinados. Nenhuma das amostras de E. coli produziu a toxina ST ou possuía o fator de colonização CFA/I e o antígeno K88. Das amostras enterotoxigênicas, correspondentes a pacotes distintos de alimento, foram isoladas 9 amostras e sorotipadas. Quatro pertenciam ao sorotipo 0149:H10, tinham o mesmo padrão de fermentação de açúcares e eram igualmente resistentes a estreptomicina e a tetraciclina. Uma das amostras enterotoxigênicas era do sorotipo 0151:H8, e as demais não puderam ser sorotipadas.

Também em S. Paulo, SATO e cols.⁽⁹⁹⁾ efetuaram a pesquisa de ETEC em esgoto, águas superficiais e água potável contaminada, revelando a presença destas bactérias em 7 (1,9%) das 365 amostras de esgoto e em 12 (2,4%) das 494 amostras de água examinadas. Todas as ETEC isoladas produziram somente a enterotoxina LT, com exceção de apenas uma, proveniente de esgoto, que produziu ambas as toxinas. Nenhuma delas apresentou os fatores de colonização CFA/I e CFA/II, e a maioria foi sensível aos antibióticos testados. Grande diversidade de sorotipos foi encontrada, alguns dos quais associados com diarreia em humanos.

Os dados aqui apresentados evidenciam a potencialidade das linhagens patogênicas de E. coli em provocar surtos de gastren

terite, de dimensões e gravidade variadas. Entretanto, poucos são os dados epidemiológicos sobre a incidência destas bactérias patogênicas nos alimentos, que podem transformar-se em via de infecção do homem e mesmo de animais.

O objetivo deste trabalho foi fazer um estudo sobre a frequência com que E. coli enterotoxigênica (ETEC), E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) e E. coli invasora (EIEC) são isoladas de alimentos que consumimos diariamente, sejam eles de origem animal ou vegetal, processados ou não. Além disso, propusemo-nos a investigar algumas propriedades das amostras patogênicas eventualmente isoladas, no sentido de estabelecer um paralelo com amostras provenientes de outras fontes.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Amostras de alimentos

O isolamento de E. coli de alimentos foi realizado em 2 fases.

Na primeira fase, foi testado um total de 166 amostras de alimentos, assim distribuídas: 30 amostras de alface, 40 de salsicha, 44 de pimenta do reino, 42 de leite pasteurizado tipo B e 10 de leite pasteurizado tipo especial. As alfaces foram coletadas no CEAGESP, de São Paulo, e as demais amostras foram adquiridas no comércio local, compreendido por açougues, supermercados, padarias e feiras-livres. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e examinadas até 2 h após a coleta.

Na segunda fase, o isolamento das amostras de E. coli de alimentos foi realizado pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo. Houve uma grande variedade de alimentos envolvidos, num total de 194 amostras, assim agrupadas: 106 amostras de carne, 28 amostras de leite, 14 amostras de queijo, 14 de vegetais, 6 de suco de frutas, 20 de refeições preparadas e 6 de alimentos mistos. Das 106 amostras de carne, 56 eram de amostras cruas, sendo 28 de carne bovina, 21 de carne de frango, 5 de pescado e 2 de carne suína. As demais amostras de carne eram 20 de carne congelada (16 de carne bovina e 4 de carne de frango), 13 de carne triturada (12 de carne bovina e 1 de fran

go), e as 17 restantes eram amostras de carne processada (salsicha, linguiça, salame, etc). As amostras de leite foram tanto de leite dos tipos B e especial, como amostras de leite servidas juntamente com refeições. As amostras de queijo foram principalmente mussarela e estepe. As 14 amostras de vegetais foram correspondentes a 8 amostras de salada e 6 amostras de vegetais moidos (farinhas). Os "alimentos mistos" foram considerados aqueles nos quais participaram de sua formulação tanto matérias primas de origem vegetal como de origem animal, por exemplo, bolo, maionese, farinha lactea, biscoito, macarrão, etc.

A Tabela 1 permite melhor visualização da distribuição das amostras.

2.2 - Isolamento de E. coli

Na 1a. fase do trabalho, as amostras de E. coli foram isoladas dos alimentos segundo a técnica proposta por SACK e cols.⁽⁹⁷⁾. 25g do alimento foram pesados assepticamente, cortados em pequenos pedaços quando necessário, utilizando-se uma faca esterilizada e homogeneizados com 225 ml de caldo MacConkey em liquidificador com copo previamente esterilizado. A velocidade de homogeneização usada foi a mais baixa possível, para evitar a formação de espuma em excesso. A mistura assim obtida foi transferida a um erlenmeyer estéril e incubada a 35°C durante 20 h. Uma alíquota de 0,1 ml desta cultura foi transferida para um erlenmeyer contendo 30 ml de caldo lauril sulfato triptose, incubado a 44°C durante 20 h. Decorrido este tempo de incubação, a cultu-

ra foi semeada em agar McConkey, com alça, e incubada a 35°C durante 18-24 h. As colônias suspeitas de E. coli foram identificadas pelos testes bioquímicos propostos por FONTES⁽³²⁾, empregando 3 meios de cultura: EPM⁽¹¹³⁾, Mili⁽¹¹²⁾ e Citrato de Simmons⁽²¹⁾. No meio EPM observa-se produção de gás, de H₂S, de L-triptofano de-saminase e urease. No meio Mili detecta-se a motilidade, a produção de indol e de L-lisina descarboxilase e no meio Citrato de Simmons observa-se a utilização do citrato. Para cada amostra de alimento analisada foram isoladas, na quase totalidade dos casos, 10 colônias de E. coli com comportamento bioquímico característico. Foi obtido um total de 910 amostras de E. coli, provenientes de 93 amostras de alimentos positivos para E. coli (73 amostras de alimentos não continham E. coli).

Na 2a. fase do trabalho, as amostras de E. coli foram fornecidas pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, já isoladas de alimentos, e mantidas em meio RUGAI ou IAL, por, no máximo, 15 dias à temperatura ambiente. As amostras assim chegadas ao laboratório foram semeadas em agar McConkey e o comportamento bioquímico das colônias típicas de E. coli foi confirmado pelos testes bioquímicos já mencionados. Houve variação de 1 até 10 amostras de E. coli diferentes para uma mesma amostra de alimento, obtendo-se um total de 441 amostras de E. coli diferentes correspondentes à 194 amostras de alimentos.

A distribuição de todas as amostras de E. coli isoladas de alimentos pode ser observada na Tabela 2.

Todos os meios de cultura empregados eram produzidos por Difco Laboratórios.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de alimentos envolvidos no isolamento de E. coli

Alimentos		Número de amostras
1a. Fase*	Alface	30
	Pimenta do reino	44
	Salsicha	40
	Leite Pasteurizado	52
	Total	166
2a. Fase**	Carne crua	bovina 28
		suina 2
		frango 21
		pescado 5
	Carne congelada	bovina 16
		frango 4
	Carne triturada	bovina 12
		frango 1
	Carne processada	17
	Total	106
	Leite	28
	Queijo	14
	Vegetal	14
	Suco de fruta	6
	Refeições preparadas	20
	Alimentos mistos	6
	Total	194
TOTAL		360

* amostras analisadas segundo metodologia de SACK e cols. (97)

** amostras analisadas na Secção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

Tabela 2 - Distribuição das amostras de E. coli isoladas de alimentos.

Alimentos		Nº de amostras de <u>E. coli</u>
1a. Fase*	Alface	290
	Pimenta do reino	210
	Salsicha	290
	Leite	120
	Total	910
2a. Fase**	Carne crua	
	bovina	50
	suína	9
	frango	73
	pescado	12
	Carne congelada	
	bovina	19
	frango	2
	Carne triturada	
	bovina	21
	frango	4
	Carne processada	29
	Total	219
	Leite	77
	Queijo	44
	Vegetal	41
	Suco de fruta	11
	Refeições preparadas	40
	Alimentos mistos	9
	Total	441
TOTAL		1351

* E.coli isolada pela metodologia de SACK e cols. (97)

** E.coli fornecida pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

2.3 - Sorotipagem para pesquisa de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC)

Todas as amostras de E. coli foram sorotipadas para investigação daquelas pertencentes ao grupo das E. coli enteropatogênicas clássicas (EPEC), utilizando-se antisoros poli e monovalentes da Probac do Brasil Prod. Bacteriológicos Ltda. Foram usados 2 soros polivalentes: o poli A, que contém os anticorpos contra os antígenos 026, 055, 0111 e 0127 e o poli B, com anticorpos contra os antígenos 086, 0119, 0125, 0126 e 0128.

A metodologia usada foi a da aglutinação em lâmina proposta por EDWARDS e EWING⁽²¹⁾. O antígeno usado para o teste foi a suspensão bacteriana obtida com cerca de 0,3 ml de salina estéril adicionada a uma cultura bacteriana de 24 h em meio EPM ou em Agar Nutriente inclinado.

Quando se observou positividade na aglutinação com os soros polivalentes, efetuou-se o teste com os soros monovalentes correspondentes. Os testes positivos em lâmina foram repetidos com as culturas aquecidas em banho-maria fervente durante 1h, e com diluição seriada do soro, para observação do título da reação.

2.4 - Sorotipagem para pesquisa de E. coli invasora (EIEC)

As amostras de E. coli imóveis e negativas no teste de produção de L-lisina descarboxilase foram sorotipadas para investigação daquelas pertencentes ao grupo das E. coli invasoras (EIEC).

Foram utilizados os soros polivalentes A e B da Probac do Brasil Prod. Bacteriológicos Ltda. O soro polivalente A contém os anticorpos contra os antígenos 028ac, 029, 0136, 0144 e 0152 e o polivalente B contra os antígenos 0112ac, 0124, 0143, 0164 e 0167. Em seguida, foram utilizados os soros monovalentes correspondentes, empregando-se a metodologia recomendada por EDWARDS e EWING⁽²¹⁾.

2.5 - Teste para produção de enterotoxina termoestável (ST)

Foi utilizado o teste do camundongo recém-nascido proposto por DEAN e cols.⁽¹⁴⁾, que se baseia na dilatação das alças intestinais devido ao acúmulo de fluído provocado pela enterotoxina ST.

As amostras de E. coli foram cultivadas em tubos de ensaio grandes (20 x 200mm) contendo 4 ml de meio de Evans, incubados a 37°C durante 20-24h, sob agitação constante, na posição mais inclinada possível. As culturas foram então centrifugadas a 3000 rpm durante 30 min e os sobrenadantes transferidos para frascos estéreis e mantidos em congelador a -20°C até o momento do teste.

O teste para detectar a produção da enterotoxina ST foi realizado injetando-se diretamente no estômago de camundongos recém-nascidos (2 a 4 dias) 0,1 ml do sobrenadante descongelado e corado com Azul de Evans a 2% (1 gota para cada ml de sobrenadante). Para cada amostra foram usados 3 a 4 animais. Após um período de 4h à temperatura ambiente os animais foram sacrificados com éter e seus intestinos retirados com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Os intestinos e as carcaças dos animais com estô-

mago corado em azul foram pesados separadamente e a relação entre seus pesos calculada. O teste era considerado positivo quando esta relação era igual ou superior a 0,09. Foram incluídos nos testes um controle positivo e um negativo.

2.6 - Teste para produção de enterotoxina termolábil (LT)

O método utilizado foi o descrito por DONTA e cols.⁽¹⁷⁾ e posteriormente aperfeiçoado por SACK e SACK⁽⁹⁶⁾. Neste teste, observa-se a alteração morfológica de células de tumor de adrenal de camundongo (células Y-1) sob a ação de enterotoxina termolábil de E. coli. Estas células, que inicialmente têm forma alongada, alteram-se para uma forma arredondada.

As células Y-1 eram cultivadas e mantidas a 37°C em mistura nutriente F-10 (GIBCO) suplementada com 15% de soro fetal bovino (SFB-GIBCO), em frascos de vidro. Após 3 a 4 dias de incubação, o meio cultivo era removido dos frascos e a monocamada celular formada na superfície de crescimento era lavada com 5 ml de uma solução associada de tripsina (0,2%) e EDTA (0,02%). Um volume de 1 ml desta solução dispersante era colocado nos frascos e mantido em contato com as células à temperatura ambiente, até o início de seu desprendimento. Após agitação do frasco para completo descolamento celular, 3 ml do meio de cultura eram adicionados e pipetados continuamente até a obtenção de uma suspensão homogênea. Esta suspensão era diluída num volume de meio adequado ao número de repiques, homogeneizada e distribuída para novos frascos, que eram incubados a 37°C.

Para o teste, as células Y-1 eram cultivadas em mini-placas especiais para cultura de tecidos, contendo 96 câmaras de fundo chato. A partir de um frasco contendo uma monocamada celular completa era preparada uma suspensão de $1,5 \times 10^5$ células por ml de meio F-10 acrescido de 15% de soro fetal bovino, 0,15% de tampão HEPES (Sigma) e 0,01 mg/ml de gentamicina. Um volume de 0,25 ml desta suspensão era inoculado em cada câmara de microplaca, que era incubada a 37°C por 48 h.

Em cada câmara da microplaca eram inoculados 0,025 ml dos sobrenadantes das culturas preparados conforme descrito anteriormente. As leituras eram efetuadas 6 a 24h após incubação a 37°C, utilizando-se o microscópio invertido. Em cada placa era sempre incluído um controle positivo e um negativo.

2.7 - Pesquisa do antígeno O das amostras de E. coli enterotoxigênica

As amostras de E. coli positivas para os testes de produção de enterotoxina ST e/ou LT foram testadas para verificar se pertenciam aos sorogrupos mais frequentes entre as E. coli enterotoxigênicas isoladas de fezes. Foram utilizados antissoros polivalentes (I a IV), preparados na Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, os quais compreendem 12 sorogrupos de E. coli encontrados com maior frequência entre as amostras enterotoxigênicas. O soro polivalente I tem anticorpos contra os antígenos 025, 062, 078; o polivalente II contra os antígenos 08, 015 e 060; o polivalente III contra os antígenos 06, 020 e 063 e poli

valente IV contra os antígenos 0128ac, 0139 e 0148.

As amostras foram cultivadas em agar nutriente (DIFCO) inclinado, a 37°C durante 18-24 h e o crescimento resuspenso em 1 ml de PBS estéril. A suspensão assim obtida foi aquecida em banho-maria fervente durante 30 min, e, em seguida, fez-se o teste de aglutinação em lâmina com os soros polivalentes I, II, III e IV, segundo a técnica de EDWARDS e EWING⁽²¹⁾. Quando o teste de aglutinação com os soros polivalentes foi positiva, repetiu-se o teste com os soros monovalentes correspondentes. Cada reação de aglutinação positiva em lâmina foi refeita fazendo-se a diluição seriada do soro para observação do título da reação.

2.8 - Pesquisa de fatores de colonização CFA/I e CFA/II

A pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II foi realizada nas amostras de E. coli enterotoxigênica isoladas dos alimentos, empregando-se o teste de hemaglutinação manose resistente proposto por EVANS e cols.⁽²⁸⁾. Para pesquisa do fator CFA/I foi utilizado o teste da aglutinação em lâmina com hemáceas humanas do tipo A e hemáceas bovinas. Para pesquisa do fator CFA/II a hemaglutinação foi feita com hemáceas bovinas, a frio.

As amostras de E. coli foram cultivadas em agar CFA por 24 h a 37°C. As suspensões de hemáceas foram obtidas por centrifugação do sangue colhido em Alsever, e lavagens sucessivas em PBS. Em seguida adicionou-se D-manose e PBS em volume suficiente para o preparo de uma suspensão final contendo 5% de hemáceas e 1% de D-manose.

Em uma lâmina, homogeneizou-se uma gota de suspensão de hemáceas com um pouco de crescimento bacteriano retirado da placa de CFA, com auxílio de um palito de madeira estéril. Para aglutinação das hemáceas bovinas, as lâminas de teste foram colocadas sobre gelo.

As amostras de E. coli que causaram aglutinação manose resistente de hemáceas humanas e bovinas foram testadas com soro anti CFA/I para confirmação. Por outro lado, as amostras de E. coli que aglutinaram apenas hemáceas bovinas foram testadas com soro anti CFA/II. Os soros anti CFA/I e anti CFA/II foram cedidos pela Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina.

2.9 - Teste de sensibilidade a drogas

O teste de sensibilidade a drogas foi realizado com as amostras de E. coli enterotoxigênicas e patogênicas clássicas isoladas de alimentos neste trabalho. Utilizou-se o método clássico de BAUER e cols.⁽²⁾, empregando-se discos Sensifar para antibiograma, produzidos por Cefar Farmaco Diagnóstica Ltda. Os seguintes discos foram utilizados:

- KN - kanamicina (30 mcg)
- CO - cloranfenicol (30 mcg)
- TB - tobramicina (10 mcg)
- CR - carbenicilina (100 mcg)
- AP - ampicilina (10 mcg)
- CF - cefalotina (30 mcg)
- ST - Sulfatrim (25 mcg) (Sulfametox + Trimetoprim)

TT - tetraciclina (30 mcg)
GN - gentamicina (10 mcg)
PL - polimixina B (300 unid.)
SF - sulfonamidas (300 mcg)
NT - nitrofurantoina (300 mcg)
AM - amicacina (30 mcg)
ET - estreptomicina (10 mcg)

As culturas de E. coli para o teste foram obtidas em agar Mueller-Hinton, e as leituras foram efetuadas após incubação a 37°C durante 18-24 h.

2.10 - Caracterização bioquímica

A identificação bioquímica das amostras foi feita pelo método descrito por EDWARDS e EWING⁽²¹⁾. Os seguintes açúcares foram utilizados nos testes de fermentação: glicose (GLI), lactose (LAC), sacarose (SAC), manitol (MAN), dulcitol (DUL), salicina (SAL), adonitol (ADO), inositol (INO), sorbitol (SOR), arabinose (ARA), rafinose (RAF), ramnose (RAM), xilose (XIL), trealose (TRE), celobiose (CEL) e maltose (MAL).

As amostras de E. coli foram cultivadas em agar de fermentação de açúcares, contendo o açúcar na concentração final de 0,5% (glicose, lactose, sacarose e manitol foram usados a 1%). As leituras foram realizadas após 1 a 7 dias de incubação a 35°C, observando-se a acidificação do meio.

2.11 - Meios de cultura e soluções

Estão descritos os meios de cultura formulados e as soluções usadas no presente trabalho, bem como a maneira de prepará-los.

2.11.1 - Meio EPM

2.11.1.1 - Solução A

Tryptona	10 g
Extrato de carne	2 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato de sódio dibásico	2 g
L-triptofano	1 g
Agar	11 g
Indicador*	2 mL
Água destilada	1 L

*Indicador: solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%

Dissolver os ingredientes, acertar o valor do pH para 7,4 e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.1.2 - Solução B

Citrato de ferro amoniacal	2 g
Tiossulfato de sódio	2 g
Glicose	10 g
Uréia	40 g
Água destilada	85 mL

Dissolver os ingredientes e aquecer em banho maria a 65°C com agitação constante, durante 1 h.

2.11.1.3 - Preparo final do meio

Solução A	1000	mℓ
Solução B	17,5	mℓ

Após resfriar a solução A a 65°C, adicionar a solução B. Distribuir 5 ml em tubos de ensaio 12 x 120 mm previamente esterilizados e deixar solidificar em posição inclinada.

2.11.2 - Meio Mili

Extrato de levedura	3	g
Peptona	10	g
Triptona	10	g
L-lisina	10	g
Glicose	1	g
Agar	2	g
Bromocresol púrpura	0,02	g
Água destilada	1	ℓ

Dissolver os ingredientes e aquecer para dissolução completa. Distribuir 4 ml em tubos 12 x 120 mm e autoclavar a 121°C durante 15 min. Deixar solidificar em posição vertical.

2.11.3 - Meio de Evans (= meio CAYE)

2.11.3.1 - Solução A

Extrato de levedura	1,8	g
Água destilada	50	mℓ

Dissolver e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.3.2 - Solução B

Casaminoácidos	6	g
NaCl	0,8	g
K ₂ HPO ₄	2,6	g
Água destilada	250	ml

Dissolver os ingredientes, acertar o valor do pH para 8,5, e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.3.3 - Solução C

MgSO ₄ .7H ₂ O	5	%
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5	%
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5	%

Dissolver em ácido sulfúrico 0,01 M, e esterilizar por filtração.

2.11.3.4 - Preparo final do meio

Solução A	50	ml
Solução B	250	ml
Solução C	0,3	ml

Misturar e distribuir 4 ml em tubos de ensaio 18 x 180 mm.

2.11.4 - Meio CFA

2.11.4.1 - Solução A

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	g
Água destilada	50	ml

Dissolver e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.4.2 - Solução B

MgCl ₂ .4H ₂ O	0,39 g
Água destilada	50 mL

Dissolver e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.4.3 - Solução C

Casaminoácidos	1 g
Extrato de levedura	0,15 g
Agar	2 g
Água destilada	100 mL

Dissolver os 2 primeiros componentes, ajustar o valor do pH para 7,4, acrescentar o agar, completar o volume e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.4.4 - Preparo final do meio

Esfriar a solução C a 60°C e adicionar 1 ml da solução A e 1 ml da solução B. Distribuir em placas.

2.11.5 - Meio para fermentação de carboidratos.

2.11.5.1 - Agar base

Peptona	10 g
Extrato de carne	3 g
NaCl	5 g
Indicador de Andrade	10 mL
Agar	5 g
Água destilada	1 L

Dissolver os ingredientes, ajustar o valor do pH para 7,1-7,2, adicionar o agar e autoclavar a 121°C durante 15 min.

2.11.5.2 - Indicador de Andrade

Água destilada	100	mℓ
Fucsina ácida	0,5	g
NaOH 1N	16	mℓ

Dissolver e manter em geladeira.

2.11.5.3 - Solução de açúcares

Glicose, lactose, sacaro <u>s</u> e e manitol	1%
Outros açúcares	0,5%

Esterilizar por filtração ou autoclavação a 121°C durante 5 min.

2.11.5.4 - Preparo final do meio

Adicionar a solução de açúcar ao agar base e distribuir 4 ml em tubos 12 x 120 mm. Deixar solidificar na posição vertical.

2.11.6 - Alsever (solução conservadora de sangue)

Glicose	2,05	g
Citrato de sódio	0,8	g
NaCl	0,42	g
Água destilada	100	mℓ

Dissolver os ingredientes e ajustar o valor do pH para 6,1 com ácido cítrico a 5%. Esterilizar aquecendo a 100°C por 1/2 h durante 3 dias. Usar partes iguais de sangue e Alsever.

2.11.7 - PBS 0,01 M pH 7,2

Solução A:	Na_2HPO_4	14,2 g/ℓ
Solução B:	KH_2PO_4	13,6 g/ℓ

Medir o valor do pH da solução A e ajustar para 7,2 com solução B. Acrescentar 8,5g de NaCl para cada 100ml de tampão . Para uso, diluir 1:10 em água destilada estéril.

3 - RESULTADOS

3.1 - Isolamento de amostras de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC)

Foram isoladas 5 amostras de E. coli enteropatogênica clássica, provenientes de 5 amostras de alimentos diferentes. Os alimentos dos quais foram isolados e seus correspondentes sorogrupos estão descritos na Tabela 3. Na Tabela 4 foram colocados os dados referentes a frequência com que EPEC foi isolada dos alimentos.

Tabela 3 - Amostras de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) isoladas de alimentos.

Amostra			Alimento	Nº do alimento	Sorogrupo
EPEC	nº	1	Salsicha	13	0125
EPEC	nº	2	Salsicha	25	0125
EPEC	nº	3	Frango cru	83	0125
EPEC	nº	4	Frango cru	133	0125
EPEC	nº	5	Leite pasteurizado	98	026

Tabela 4 - Frequência de isolamento de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) em alimentos

	1a. fase [*]	2a. fase ^{**}	Total
Alimentos estudados	93 ^{***}	194	287
Amostras de <u>E. coli</u> isoladas	910	441	1351
Alimentos contendo EPEC	2 (2,2%)	3 (1,5%)	5 (1,7%)
Amostras de EPEC	2 (0,2%)	3 (0,7%)	5 (0,4%)

^{*}E. coli isolada pela metodologia de SACK e cols. (97)

^{**}E. coli fornecida pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz

^{***}Considerados somente os alimentos contendo E. coli

3.2 - Isolamento de amostras de E. coli invasora (EIEC)

Não foi isolada nenhuma amostra de E. coli invasora em nenhum dos alimentos analisados.

3.3 - Isolamento de amostras de E. coli enterotoxigênica (ETEC)

Foram isoladas 17 amostras de E. coli enterotoxigênica, sendo 13 amostras produtoras de LT e 4 de ST. Não foram isoladas amostras de E. coli capazes de produzir ambas as toxinas. Das 13 amostras de E. coli com o fenótipo LT^+ST^- , 5 provinham de uma mesma amostra de salsicha e 3 de uma mesma amostra de carne cozida. Das 4 amostras de E. coli com fenótipo enterotoxigênico LT^-ST^+ , 2 eram provenientes de uma mesma amostra de carne moída (hamburguer). Na Tabela 5 estão apresentados os alimentos envolvidos no isolamento de amostras ETEC, e na Tabela 6 estão as frequências com que estes microrganismos foram encontrados.

Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados, resumidamente, as frequências de isolamento de alimentos contendo E. coli enteropatógena e de isolamento de EPEC, ETEC e EIEC entre o total de E. coli estudado, respectivamente.

3.4 - Pesquisa dos antígenos O das amostras enterotoxigênicas

O teste de aglutinação com os soros polivalentes I, II, III e IV não permitiu identificar o sorogrupo de nenhuma das amos-

tras enterotoxigênicas isoladas. Seis amostras de E. coli estavam rugosas no momento do teste, as 11 demais devem possuir antígenos 0 diferentes daqueles detectáveis por estes soros.

3.5 - Pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II

Das 17 amostras de E. coli enterotoxigênica isoladas de alimentos, nenhuma produziu CFA/I ou CFA/II.

3.6 - Teste de sensibilidade a drogas

Este teste, realizado com todas as amostras de ETEC e de EPEC isoladas, permitiu a identificação de uma amostra LT^+ST^- e uma 0125 com resistência múltipla, uma amostra 026 com resistência à tetraciclina e estreptomicina e uma amostra LT^+ST^- com resistência à tetraciclina apenas. As demais amostras foram sensíveis à todas as drogas empregadas. Os resultados referentes à estes testes estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

3.7 - Caracterização bioquímica

Nas Tabelas 11 e 12 estão apresentados os resultados do teste de fermentação de açúcares realizado com as amostras de E. coli enteropatogênicas clássicas e enterotoxigênicas, respectivamente.

TABELA 5 - Amostras de E. coli enterotoxigênica (ETEC) isoladas de alimentos.

Amostra	Alimento	Nº do alimento	Fenótipo enterotoxigênico
ETEC nº 1	Salsicha	38	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 2	Salsicha	38	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 3	Salsicha	38	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 4	Salsicha	38	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 5	Salsicha	38	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 6	Pimenta do reino	25	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 7	Carne moída cozida	18	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 8	Maionese	34	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 9	Carne cozida	41	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 10	Carne cozida	41	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 11	Carne cozida	41	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 12	Leite	67	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 13	Carne crua	190	LT ⁺ ST ⁻
ETEC nº 14	Alface	29	LT ⁻ ST ⁺
ETEC nº 15	Hamburguer	39	LT ⁻ ST ⁺
ETEC nº 16	Hamburguer	40	LT ⁻ ST ⁺
ETEC nº 17	Hamburguer	40	LT ⁻ ST ⁺

Tabela 6 - Frequência de isolamento E. coli enterotoxigênica (ETEC) de alimentos

	1a. fase [*]	2a. fase ^{**}	Total
Alimentos estudados	93 ^{***}	194	287
Amostras de <u>E. coli</u> estudadas	910	441	1351
Alimentos com ETEC	3 (3,3%)	7 (3,6%)	10 (3,5%)
Amostras de ETEC	7 (0,8%)	10 (2,3%)	17 (1,3%)
Alimentos com ETEC LT ⁺ ST ⁻	2 (2,2%)	5 (2,6%)	7 (2,5%)
Amostras de ETEC LT ⁺ ST ⁻	6 (0,7%)	7 (1,6%)	13 (1,0%)
Alimentos com ETEC LT ⁻ ST ⁺	1 (1,1%)	2 (1,0%)	3 (1,0%)
Amostras de ETEC LT ⁻ ST ⁺	1 (0,1%)	3 (0,7%)	4 (0,3%)

^{*} E. coli isolada pela metodologia de SACK e cols. (97)

^{**} E. coli fornecida pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz

^{***} Considerados somente os alimentos contendo E. coli

Tabela 7 - Frequência de isolamento de EPEC, ETEC e EIEC em amostras de alimentos

Nº total de amostras de alimentos estudados	360		
Nº de amostras de alimentos contendo <u>E. coli</u>	287		
Nº de amostras de alimentos contendo <u>E. coli</u> enteropatogênica	15	(4,2%)*	(5,2%)**
Nº de amostras de alimentos contendo EPEC	5	(1,4%)*	(1,7%)**
Nº de amostras de alimentos contendo ETEC	10	(2,8%)*	(3,5%)**
Nº de amostras de alimentos contendo EIEC	0	(0%)*	(0%)**

* Em relação ao nº total de amostras de alimentos estudados

** Em relação ao nº de amostras de alimentos contendo E. coli

EPEC - E.coli enteropatogênica clássica

ETEC - E.coli enterotoxigênica

EIEC - E.coli invasora

Tabela 8 - Frequência de isolamento de EPEC, ETEC e EIEC entre amostras de E. coli isoladas de alimentos

Nº total de amostras de <u>E. coli</u> isoladas de alimentos	1351	
Nº total de <u>E. coli</u> enteropatogênica isolado	22	(1,6%)
Nº total de EPEC isolado	5	(0,4%)
Nº total de ETEC isolado	17	(1,3%)
Nº total de ETEC produtora somente de toxina ST isolado	4	(0,3%)
Nº total de ETEC produtora somente de toxina LT isolado	13	(1,0%)
Nº total de ETEC produtora das toxinas LT e ST isolado	0	(0%)
Nº total de EIEC isolado	0	(0%)

EPEC - E. coli enteropatogênica clássica

ETEC - E. coli enterotoxigênica

EIEC - E. coli invasora

Tabela 9 - Teste de sensibilidade a drogas das amostras de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) isoladas de alimentos.

Amostras	KN	CO	TB	CR	AP	CF	ET	TT	GN	PL	SF	NT	AM	ST
EPEC nº 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EPEC nº 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EPEC nº 3	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R
EPEC nº 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EPEC nº 5	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S

KN = kanamicina, CO = cloranfenicol; TB = tobramicina; CR = carbenicilina; AP = ampicilina; CF = cefalotina; ET = estreptomicina; TT = tetraciclina; GN = gentamicina; PL = polimixina; SF = sulfonamidas; NT = nitrofurantoina; AM = amicacina; ST = sulfatrim (sulfametox + trimetoprim).

S = sensível

R = resistente

Tabela 10 - Teste de sensibilidade a drogas das amostras de E. coli enterotoxigênica (ETEC) isoladas de alimentos

Amostras			KN	CO	TB	CR	AP	CF	ET	TT	GN	PL	SF	NT	AM	ST
ETEC	nº	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	11	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	12	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETEC	nº	17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

KN = kanamicina; CO = cloranfenicol; TB = tobramicina; CR = carbenicilina; AP = ampicilina; CF = cefalotina; ET = estreptomicina; TT = tetraciclina; GN = gentamicina; PL = polimixina; SF = sulfonamidas; NT = nitrofurantoina; AM = amicacina; ST = sulfatrim (sulfametox + trimetoprim).

S = sensível

R = resistente

Tabela 11 - Fermentação de açúcares das amostras de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) isoladas de alimentos

Amostras	GLI	LAC	SAC	MAN	DUL	SAL	ADO	INO	SOR	ARA	RAF	RAM	XIL	TRE	CEL	MAL
EPEC nº 1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
EPEC nº 2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	(+)	+	+	-	+
EPEC nº 3	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
EPEC nº 4	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
EPEC nº 5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+

GLI = glicose; LAC = lactose; SAC = sacarose; MAN = manitol; DUL = dulcitol; SAL = salicina ; ADO = adonitol; INO = inositol; SOR = sorbitol; ARA = arabinose; RAF = rafinose; RAM = ramnose; XIL = xilose; TRE = trealose; CEL = celobiose; MAL = maltose.

+ = teste positivo com 1 dia de incubação

(+) = teste positivo com 2 ou mais dias de incubação

- = teste negativo com 7 dias de incubação

Tabela 12 - Fermentação de açúcares das amostras de E. coli enterotoxigênica (ETEC) isoladas de alimentos

Amostras	GLI	LAC	SAC	MAN	DUL	SAL	ADO	INO	SOR	ARA	RAF	RAM	XIL	TRE	CEL	MAL
ETEC nº 1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	(+)	-	+
ETEC nº 5	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	(+)	-	+
ETEC nº 6	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 7	+	+	-	+	(+)	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	(+)
ETEC nº 8	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 9	+	+	+	+	+	(+)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 10	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 11	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 12	+	+	-	+	-	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
ETEC nº 13	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	(+)	+	+	+	-	+
ETEC nº 14	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 15	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 16	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ETEC nº 17	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	(+)	+	+	+	-	+

GLI = glicose; LAC = lactose; SAC = sacarose; Man = manitol; DUL = dulcitol; SAL = salicina; ADO = adonitol; INO = inositol; SOR = sorbitol; ARA = arabinose; RAF = rafinose; RAM = ramnose; XIL = xilose; TRE = trealose; CEL = celobiose; MAL = maltose.

+ = teste positivo com 1 dia de incubação

(+) = teste positivo com 2 ou mais dias de incubação

- = teste negativo com 7 dias de incubação

4 - DISCUSSÃO

70722

De 360 amostras de alimentos analisados foram isoladas 1351 amostras de E. coli, que foram estudadas quanto à capacidade de produção de enterotoxinas e sorotipadas para identificação daquelas pertencentes ao grupo das enteropatogênicas clássicas e das invasoras. Das amostras de E. coli obtidas, apenas 17 foram produtoras de enterotoxinas, sendo 13 produtoras somente da toxina LT e 4 produtoras apenas da toxina ST. Não foram isoladas amostras de E. coli produtoras de ambas as toxinas. Cinco amostras de E. coli foram classificadas como pertencentes ao grupo das E. coli enteropatogênica clássica. Nenhuma amostra de E. coli pertenceu ao grupo das E. coli invasora. As 22 amostras patogênicas assim divididas corresponderam a apenas 1,6% do total de E. coli estudado. Estas amostras estavam distribuídas em 15 alimentos diferentes, correspondendo a 4,2% do total de amostras de alimentos estudados, e a 5,2% das amostras de alimentos contaminados com E. coli.

As seguintes amostras de alimentos estiveram envolvidas no isolamento de E. coli enterotoxigênica: 2 amostras de hamburguer, 2 amostras de carne cozida (uma delas era carne moída cozida), 1 amostra de salsicha, 1 de carne crua, 1 de leite pasteurizado, 1 de pimenta do reino, 1 de maionese e 1 de alface. As amostras de E. coli produtoras de toxina ST foram isoladas das duas amostras de hamburguer e da amostra de alface. Os demais alimen

tos tinham E. coli produtora de toxina LT. As amostras enteropatógenicas clássicas foram isoladas de 5 alimentos diferentes: 2 amostras de salsicha, 2 de frango cru e 1 de leite pasteurizado. Apenas 2 sorogrupos foram obtidos: 026, no leite, e 0125 nas outras 4 amostras de alimento.

De um modo geral, a frequência das linhagens enteropatógenicas de E. coli encontrada nos alimentos componentes do presente estudo foi relativamente baixa. No entanto, elas não estavam completamente ausentes, como parecia ser possível, já que diversos autores^(19,34,35,40,57) encontraram frequência de ETEC e EPEC igual a zero em centenas de amostras de alimentos estudados.

A frequência de alimentos contendo ETEC que observamos neste estudo foi da ordem de 3,5% dos alimentos contaminados com E. coli e da ordem de 2,8% do total de alimentos testados. Se considerarmos somente os alimentos de origem animal, que foram 201, a frequência de alimentos com ETEC sobe para 5%. Esta frequência fica próxima da observada por SACK e cols.⁽⁹⁷⁾ e por REIS e cols.⁽⁹²⁾, que verificaram que a frequência de isolamento de ETEC de alimentos é da ordem de 5 a 10%. Deve-se esclarecer que, para o cálculo da frequência, foram considerados também de origem animal os "alimentos mistos" e as "refeições preparadas", uma vez que fazem parte de sua composição ingredientes de origem animal como carne, leite, ovos, etc.

Com relação às cepas enterotoxigênicas isoladas neste trabalho, alguns resultados interessantes foram obtidos. Inicialmente, chamou-nos a atenção o fato de nenhuma das ETEC isoladas ser capaz de produzir as duas enterotoxinas simultaneamente. Em investigações recentes sobre a etiologia da diarreia endêmica

de crianças em São Paulo, REIS e cols.⁽⁹¹⁾ verificaram que as amostras de ETEC produtoras de LT e ST e somente de ST ocorriam com maior frequência em crianças com diarreia do que em controles. As amostras produtoras de LT, entretanto, foram mais frequentes nos controles do que nas crianças doentes, desde que tivessem idade superior a 1 ano. Por outro lado, GUTH⁽⁴⁴⁾, trabalhando com fezes de crianças de várias idades, observou que 54% e 26% das amostras de ETEC isoladas de fezes diarreicas eram produtoras somente de LT e somente de ST, respectivamente, e apenas 20% das fezes diarreicas continham ETEC produtora de ambas as toxinas.

A presença de amostras de ETEC produtoras somente de toxina LT em água e alimentos brasileiros já havia sido observada anteriormente por outros pesquisadores^(92,99). É digno de nota que estes autores pesquisaram a produção de ST somente em amostras de E. coli que já haviam acusado a capacidade de produção de LT, conseqüentemente, não seria possível detectar amostras que produzissem somente a toxina ST. Já, em nosso trabalho, foi possível o isolamento de algumas amostras produtoras apenas da toxina ST, uma vez que todas as E. coli isoladas de alimentos foram testadas em camundongos recém-nascidos. A predominância em alimentos de amostras enterotoxigênicas produtoras apenas de toxina LT foi também observada por SACK e cols.⁽⁹⁷⁾. Das amostras produtoras de LT por eles isoladas, 58% produziam somente esta toxina. Estes autores isolaram também amostras produtoras somente de ST, em frequência semelhante às produtoras de LT, indicando a necessidade de efetuar o teste do camundongo recém-nascido mesmo em amostras não produtoras de LT.

Os antissoros disponíveis não permitiram que se identificasse os sorogrupos das amostras de ETEC isoladas de alimentos.

Estes antissoros, preparados com amostras de ETEC pertencentes aos sorogrupos mais frequentemente isolados no Brasil e em outros países, detectam amostras pertencentes aos sorogrupos 06, 08, 015, 020, 025, 060, 063, 078, 0128, 0139 e 0148. Amostras de ETEC produtoras somente de toxina LT pertencem a uma grande variedade de sorogrupos^(80,91), que não são detectáveis pelos antissoros mencionados. Portanto, a impossibilidade de se determinar o sorogrupo das amostras de ETEC isoladas dos alimentos era, de certo modo, esperada. Sabe-se, pelos estudos de ØRSKOV e cols.⁽⁸⁵⁾, MERSON e cols.⁽⁸⁰⁾ e GUTH⁽⁴⁴⁾, que a utilização de antissoros O com anticorpos contra estes sorogrupos é mais efetiva na identificação de amostras produtoras de ambas as toxinas ou produtoras somente de toxina ST do que para identificação de amostras produtoras somente de LT. Além disso, deve-se levar em conta que muitas das ETEC isoladas estavam rugosas no momento do teste sorológico. Análises a serem realizadas, no futuro, com o intuito de identificar os sorogrupos das amostras isoladas de alimentos, poderão fornecer subsídios para que se faça comparações com estudos de outros autores, na tentativa de caracterizar os sorogrupos de ETEC mais frequentemente isolados de alimentos.

O fato da maioria das amostras de ETEC do presente estudo serem produtoras somente da toxina LT, explica a negatividade da pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II. A ausência destes fatores em amostras enterotoxigênicas com este fenótipo já havia sido observada por LEVINE e cols.⁽⁶⁹⁾ e REIS e cols.⁽⁹⁰⁾ em amostras isoladas de fezes, embora alguns autores tenham observado a presença de CFA/II em amostras produtoras somente de LT⁽¹⁰⁾. Resultados igualmente negativos para CFA/I foram também obtidos por REIS e cols.⁽⁹²⁾ em amostras isoladas de alimentos.

Quanto à resistência a drogas, observou-se que apenas uma amostra de ETEC apresentava resistência a várias drogas (carbenicilina, ampicilina, estreptomicina e tetraciclina) e uma a tetraciclina, isoladas de leite pasteurizado e de carne cozida, respectivamente. Em estudos anteriores, realizados por REIS e cols.⁽⁹²⁾, observou-se resistência múltipla apenas em amostras de ETEC do sorogrupo 0149 sendo as demais sensíveis as drogas testadas. É possível que a amostra isolada por nós pertença igualmente a este sorogrupo, porém, é oportuno lembrar que resistência múltipla a drogas é codificada por plasmídios, sabidamente transferíveis de uma célula bacteriana para outra. Baixa incidência de amostras de ETEC com resistência a drogas foi também observada, em S. Paulo, por SATO e cols.⁽⁹⁹⁾ em amostras isoladas de água e esgoto.

A capacidade de metabolização de açúcares foi igual para a grande maioria das amostras de ETEC. Para estas foi positiva a fermentação de glicose, lactose, sacarose, manitol, dulcitol, sorbitol, arabinose, rafinose, ramnose, xilose, trealose e maltose, após 1 ou 2 dias de incubação, e negativa a fermentação de salicina, adonitol, inositol e celobiose. Não foram encontradas amostras de ETEC fermentadoras de adonitol, que é uma propriedade das amostras enterotoxigênicas do sorotipo 06:H16^(44,91), nem salicina, que é utilizada com frequência por E. coli enterotoxigênica pertencente a vários sorogrupos⁽⁹¹⁾. A rafinose foi utilizada por 88% das ETEC, e a maltose por 100% delas, representando frequências superiores às normalmente encontradas no gênero Escherichia⁽²¹⁾. Esta propriedade já havia sido observada anteriormente por MATOS⁽⁷³⁾.

Até o momento, não existe em nosso país nenhum estudo sobre a etiologia da "diarréia do viajante". Portanto, até hoje

não se sabe se o Brasil apresenta semelhanças, neste aspecto, com outros países latino-americanos, como o México, nos quais a "diar^{reia} do viajante" é causada primordialmente pela E. coli enterotoxigênica^(41,89,111). Se, também no Brasil, ETEC for o principal agente etiológico desta síndrome, os alimentos poderão ser caracterizados como uma importante via de distribuição deste patógeno, uma vez que foi observada frequência significativa de ETEC nos alimentos aqui analisados.

Com relação à E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) sua observação só foi possível em alimentos de origem animal (sal^{sicha}, frango e leite), numa frequência de 2,5% em relação a estes e 1,7% em relação ao total de alimentos estudados. Esta baixa frequência é compatível com aquela observada por HALL e cols.⁽⁴⁹⁾, por VELAUDAPILLAI e cols.⁽¹¹⁹⁾ e por GELLI e cols.⁽³⁸⁾, porém é inferior aquela obtida por FANTASIA e cols.⁽²⁹⁾, que conseguiram isolar diversos sorogrupos de EPEC em mais de 10% das amostras de queijo por eles estudadas. As amostras componentes desta pesquisa pertencem aos sorogrupos 026 e 0125, que já haviam sido isolados de alimentos por outros autores^(38,49,119). Curiosamente, não foram observadas, nos alimentos, amostras de EPEC pertencentes aos sorogrupos 0111 e 0119, que correspondem aos sorogrupos mais frequentemente envolvidos, em nosso meio, como agentes etiológicos de gastroenterites infantis⁽¹¹⁶⁾. Foram isoladas, no entanto, amostras de EPEC dos sorogrupos 026 e 0125, mais esporadicamente associados à diarreia infantil. Alimentos contendo estes sorogrupos de E. coli, consumidos sem o tratamento térmico adequado, podem transformar-se em um importante veículo destes patógenos. As 5 amostras isoladas apresentaram um variado padrão de fermentação de

açúcares, não se identificando nenhuma característica que lhes fosse peculiar. Apresentaram diferentes perfis de resistência a drogas, sendo que a amostra pertencente ao sorogrupo 0125 isolada de frango apresentou resistência a 6 das drogas testadas, e a amostra 026 isolada do leite mostrou-se resistente apenas a tetraciclina. As demais amostras foram sensíveis a todas as drogas testadas. Estes resultados são interessantes, uma vez que a frequência de amostras de EPEC destes sorogrupos apresentando multiresistência a drogas, nas fezes, é muito baixa⁽¹¹⁶⁾.

A frequência de isolamento de amostras invasoras de E. coli (EIEC) a partir de alimentos foi nula. De certo modo, este resultado era esperado. Além das EIEC corresponderam apenas a uma pequena fração das E. coli enteropatogênicas para o homem⁽¹¹⁶⁾, contribuiu para este resultado o fato de parte das amostras de EIEC serem tardiamente fermentadoras de lactose ou mesmo não fermentadoras deste açúcar^(21,104). Esta propriedade faz com que as EIEC eventualmente presentes num alimento sejam eliminadas durante as análises microbiológicas realizadas para isolar E. coli a partir de alimentos que, normalmente, utilizam-se de uma fase de enriquecimento seletivo empregando meios de cultura contendo tensioativos (lauril sulfato de sódio, bile, sais biliares, etc) e lactose como única fonte de açúcar^(31,55). Aliás, para contornar este problema, o Comitê Internacional para Padrões Microbiológicos de Alimentos (ICMSF), que propõe técnicas a serem seguidas pelos microbiologistas de alimentos, propôs uma modificação na metodologia padrão, que elimina a etapa do enriquecimento seletivo⁽⁵⁵⁾. A eficácia desta modificação no isolamento de E. coli não fermentadoras de lactose, ou tardiamente fermentadoras deste açúcar, a

partir de alimentos contendo uma variada flora microbiana de competição precisa ser ainda esclarecida.

A frequência aqui detectada de ETEC, EPEC, EIEC em alimentos não deve, de maneira nenhuma, corresponder à sua frequência real. A metodologia usada para seu isolamento, quer seja a proposta por SACK e cols.⁽⁹⁷⁾, quer seja a adotada no Instituto Adolfo Lutz, não é a mais adequada para o isolamento de cepas patogênicas. Um estudo detalhado sobre alterações nesta metodologia visando recuperação das cepas patogênicas em alimentos foi desenvolvido por MEHLMAN e ROMERO⁽⁷⁷⁾. Segundo estes autores, a alta temperatura de incubação empregada (ao redor de 44°C), associada à presença de agentes seletivos para enterobactérias nos meios de cultura, e a presença de lactose como única fonte de açúcar, fazem com que a metodologia rotineira seja inadequada para a sobrevivência das cepas patogênicas na presença de cepas não patogênicas, normalmente mais resistentes às estas condições adversas e normalmente presentes em quantidade bem superiores. Além disso, estas condições de cultivo que objetivam a seletividade para E. coli, são inadequadas para os plasmídios que são responsáveis pela virulência de muitas das E. coli patogênicas. HILL e CARLISLE⁽⁵¹⁾ demonstraram que o enriquecimento em meio de cultura contendo lauril sulfato triptose e a incubação a 44,5°C, que constituem o método rotineiro para enumeração e isolamento de E. coli em alimentos, resultavam em perda do plasmídio responsável pela produção de enterotoxinas, e conseqüentemente diminuíam a eficiência do isolamento de ETEC dos alimentos.

Além destes fatores, seguramente deve ter influência na frequência de isolamento de cepas patogênicas em alimentos, o fa

to de ser desconhecida a proporção entre amostras de E. coli patogênicas e não patogênicas presentes simultaneamente num mesmo alimento. É impossível saber, antecipadamente, qual o número de colônias de E. coli que devem ser testadas para que se caracterize pelo menos uma patogênica. Trata-se de uma situação bem diferente da pesquisa destas amostras patogênicas em fezes diarrêicas, nas quais há predominância da cepa patogênica em relação à flora não patogênica. Neste trabalho foi observada uma grande variação, neste aspecto. Assim, a única amostra de E. coli disponível para teste de produção de enterotoxinas, isolada do leite pasteurizado, mostrou-se enterotoxigênica. Isto se repetiu no caso da carne moída cozida, de carne crua e das 2 amostras de hambúrguer. Por outro lado, apenas 1 das 10 amostras de E. coli isoladas de alface e de pimenta do reino mostraram-se produtoras de enterotoxina. Proporções intermediárias foram obtidas nos demais alimentos: 5 ETEC entre 10 E. coli, na salsicha; 3 ETEC entre 4 E. coli, na carne cozida, e 1 ETEC entre 5 E. coli, na maionese. O fenômeno se repetiu no caso das amostras de E. coli enteropatogênica clássica: 1 EPEC entre 2 E. coli, no leite pasteurizado, 1 EPEC entre 6 E. coli em uma das amostras de frango, 1 EPEC entre 10 E. coli nas 2 amostras de salsicha e na outra amostra de frango. A variação observada nos faz concluir que é impossível saber qual a parcela representada pela flora patogênica em relação à flora total de E. coli presente num determinado alimento.

Talvez mais importante do que a frequência com que foram isoladas dos alimentos é o fato de amostras patogênicas de E. coli terem sido isoladas de amostras de alimentos prontos para consumo, que não requerem nenhum tipo de processamento térmico adi-

cional. Incluem-se neste grupo, a maionese, a salsicha, o leite pasteurizado, a alface, a pimenta do reino e a carne cozida, analisadas neste estudo. Por outro lado, outros alimentos, como o hamburguer, o frango e a carne, são, muitas vezes, consumidos sem micrus, sem terem sofrido um tratamento térmico adequado para a destruição das cepas patogênicas eventualmente presentes⁽⁴³⁾.

Do ponto de vista de saúde do consumidor, os resultados observados tem implicações claras. Embora a frequência de isolamento de E. coli enteropatogênica em nossos alimentos tenha sido inferior à de outras bactérias enteropatogênicas, como Salmonella por exemplo⁽⁶⁷⁾, a via alimentar não pode deixar de ser considerada uma importante via de disseminação destes patógenos. Apesar de, em nosso meio, não serem conhecidos surtos de gastroenterite provocados por E. coli enteropatogênica veiculada por água ou por alimentos, a sua existência não pode ser ignorada, uma vez que já foram descritos em outros países. Assim sendo, fica comprovado, uma vez mais, que é fundamental o cuidado com a qualidade microbiológica de nossos alimentos, evitando que a eles tenham acesso bactérias potencialmente patogênicas, como as E. coli aqui estudadas.

5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e com a discussão apresentada, as seguintes conclusões foram obtidas:

- 1 - A incidência de E. coli enteropatogênica nos alimentos analisados foi da ordem de 4,2%, indicando que uma fração significativa de nossos alimentos contém, pelo menos, uma das linhagens enteropatogênicas de E. coli. Considerando-se somente os alimentos nos quais foi constatada contaminação com coliformes fecais (E. coli), a frequência de isolamento de cepas patogênicas sobe para 5,2%.
- 2 - A frequência observada de E. coli enteropatogênica em alimentos deve ser inferior à frequência real, tendo em vista as limitações da metodologia empregada para seu isolamento.
- 3 - As amostras enteropatogênicas foram observadas tanto em alimentos de origem animal quanto nos de origem vegetal, observando-se, no entanto, predominância nos primeiros. Foram igualmente observadas em alimentos crus e em alimentos processados industrialmente. A contaminação destes alimentos, certamente de origem fecal, pode ter sido pro-

vocada pelo homem, durante a manipulação em condições higiênicas insatisfatórias, ou proveniente de matérias primas previamente contaminadas.

- 4 - Amostras de E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) foram isoladas de 1,7% dos alimentos contaminados com E. coli, e pertenceram aos sorogrupos 026 e 0125. Corresponderam a 22,7% das amostras enteropatogênicas isoladas dos alimentos. Sua incidência em alimentos prontos para consumo, que dispensam tratamento térmico, pode representar risco à saúde da população consumidora infantil.
- 5 - Não foram isoladas amostras de E. coli invasora (EIEC), provavelmente devido à inadequação da metodologia adotada para seu isolamento.
- 6 - Amostras enterotoxigênicas de E. coli (ETEC) foram observadas em 3,5% dos alimentos contaminados com E. coli. Observou-se grande predominância de amostras produtoras somente da enterotoxina LT. As amostras de ETEC foram isoladas de vários tipos de alimentos, inclusive naqueles prontos para consumo, apresentando um risco relativamente elevado à saúde da população.
- 7 - Ficou caracterizado que a via alimentar pode ter um papel importante na "diarréia do viajante" em nosso país, dada a frequência significativa de alimentos contaminados com ETEC.
- 8 - As amostras de ETEC isoladas não apresentaram os fatores de colonização CFA/I e CFA/II, certamente devido à predominância das amostras produtoras somente da toxina LT. Esta propriedade, no entanto, pode não ser fundamental para sua pa-

togenicidade, uma vez que outros fatores de colonização , ainda desconhecidos, podem estar presentes.

- 9 - As amostras de ETEC isoladas de alimentos não pertencem aos sorogrupos mais frequentes de ETEC. Isto, provavelmente , se deve ao fato de predominarem amostras produtoras somente da toxina LT, sabidamente pertencentes a uma grande variedade de sorogrupos, não detectáveis pelos antisoros disponíveis . Seria prematura qualquer conclusão sobre o significado epidemiológico destes resultados.
- 10 - As amostras enteropatogênicas isoladas dos alimentos foram, na maioria, sensíveis aos antibióticos testados. Foram, no entanto, observadas algumas amostras resistentes a um ou vários destes antibióticos. Consequentemente, pode resultar inútil a adição ilegal de antibióticos aos alimentos, na tentativa de melhorar a sua qualidade microbiológica , pelo menos no que diz respeito às amostras enteropatogênicas aqui estudadas.
- 11 - As amostras enteropatogênicas de E. coli isoladas dos alimentos apresentaram um comportamento bioquímico bastante semelhante ao apresentado por E. coli não enteropatogênica , proveniente de alimentos ou de outras fontes. Portanto, não foi possível a caracterização de nenhuma propriedade bioquímica que facilitasse a identificação das amostras enteropatogênicas.
- 12 - Uma vez mais, ressalta-se a necessidade da melhoria das condições higiênico-sanitárias de produção dos nossos alimentos, visto que neles foi constatada não só a contaminação com microrganismos de origem fecal, mas também com microrganismos comprovadamente enteropatogênicos para o homem.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - BARNARD, R. & CALLAHAN, W. Follow-up on gastroenteritis attributed to French cheese. Morbid. Mortal. Weekly Rept., Washington, 25:445-6, 1971.
- 2 - BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.W.; SHERRIS, G.J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 45:493-6, 1966.
- 3 - BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli Neopolitanum* from summer diarrhea of infants. J. Pathol., Edinburgh, 57:239-47, 1945.
- 4 - BRUNTON, J.; HINDE, D.; LANGSTOM, C.; GROSS, R.; ROWE, B.; GURWITH, M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Central Canada. J. Clin. Microbiol., Washington, 11:343-8, 1980.
- 5 - BURGESS, M.N.; BYWATER, C.M.; COWLEY, C.M.; MULAN, N.A.; NEWSOME, P.M. Biological evaluation of a methanol soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. Infect. Immun., Washington, 21: 526-31, 1978.

---

* De acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos estão de acordo com o Chemical Abstracts Service Source Index, Easton, 1975.

- 6 - CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. Infect. Immun., Washington, 24:760-9, 1969.
- 7 - CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J.; FINKELSTEIN, R.A. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin form *Escherichia coli*. Infect. Immun., Washington, 29:91-7, 1980.
- 8 - COSTIN, I.D.; VOICULESCU, V.; GORCEA, V. An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype 086:B7:H34. Pathol. & Microbiol., Basel, 27:68-78, 1969.
- 9 - CRAVIOTO, A.; GROSS, R.J.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol., New York, 3:95-9, 1979.
- 10 - CRAVIOTTO, A.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. Hemagglutinating activity and colonization factor antigen I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immun., Washington, 36:189-97, 1982.
- 11 - DANIELSSON, M.L.; MÖLLBY, R.; BRAG, H.; HANSSON, N.; JONSSON, P.; OLSSON, E.; WADSTROM, T. Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and out-breaks of food-borne diseases in Sweden. J. Hyg.(Camb.), 83:33-40, 1979.
- 12 - DE, S.N.; BRATTACHARYA, K.; SARKAR, J.K. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 71:201-9, 1956.
- 13 - DE, S.N. & CHATTERJE, D.N. A experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on intestinal mucous membrane. J. Pathol. Bacteriol., Edinburg, 66:559-62, 1953.

- 14 - DEAN, A.G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., Chicago, 125:407-411, 1972.
- 15 - DeBOY II, J.M.; WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. Infect. Immun., Washington, 29:361-8, 1980.
- 16 - DELEPINE, S. Food poisoning and epidemic diarrhea. J. Am. Med. Assoc., Chicago, 40:657, 1903.
- 17 - DONTA, S.T.; MOON, H.W.; WHIPP, S.C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science (Washington, D.C.), 183:334-5, 1974.
- 18 - ECHEVERRIA, P.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; PLIANBANGCHANG, D. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Thailand and Philippines. Infect. Immun., Washington, 36:851-6, 1982.
- 19 - ECHEVERRIA, P.; VERHAERT, L.; BASACA-SEVILLA, V.; BANSON, T.; CROSS, J.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Search for heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans, livestock, food and water in a community in the Philippines. J. Infect. Dis., Chicago, 138:87-90, 1978.
- 20 - EDELMAN, R. & LEVINE, M.M. Summary of a workshop on Enteropathogenic *Escherichia coli* - From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. J. Infect. Dis., Chicago, 147:1108-18, 1983.
- 21 - EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 3 ed., 1972.

- 22 - EVANS, D.J.; CHEN, L.C.; CURLIN, G.T.; EVANS, D.G. Stimulation of adenylyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. Nature (London), 236:137-8, 1972.
- 23 - EVANS, D.J. & EVANS, D.G. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. Infect. Immun., Washington, 16:604-9, 1977.
- 24 - EVANS, D.G. & EVANS, D.J. A new surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. Infect. Immun., Washington, 21:638-47, 1978.
- 25 - EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; GORBACH, S.L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immun., Washington, 8:725-30, 1973.
- 26 - EVANS, D.G.; EVANS, D.J.; PIERCE, N.F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun., Washington, 7:873-80, 1973.
- 27 - EVANS, D.G.; EVANS, D.J.; TJOA, W. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. Infect. Immun., Washington, 18:330-37, 1977.
- 28 - EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J.; CHASE, D.G.; GORBACH, S.L. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. Infect. Immun., Washington, 12:656-667, 1975.

- 29 - FANTASIA, L.D.; MISTRANDEA, L.; SCHRADE, J.P.; YAGER, J.
Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli*
in soft rippened cheese. Appl. Microbiol., Washington ,
29:179-85, 1975.
- 30 - FERGUSON, W.W. & JUNE, R.C. Experiments on feeding adult
volunteers with *E.coli* 0111:B4, a coliform organism asso-
ciated with infant diarrhea. Am. J. Hyg., Baltimore,
55:155-69, 1952.
- 31 - FISHBEIN, M.; MEHLMAN, I.J.; CHUGG, L.; OLSON, J.C. Coliforms,
fecal coliforms, *E.coli* and enteropathogenic *E.coli*. In:
SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological
examination of foods. Washington, American Public Heath
Association, 1972, p.227.
- 32 - FONTES, C.F. Proposição de dois novos meios de cultura e de
um sistema simplificado para identificação de enterobacté-
rias. São Paulo, 1972, 78 p. | Dissertação de Mestrado -
Escola Paulista de Medicina |.
- 33 - FORMAL, B.S. & HORNICK, R.B. Invasive *Escherichia coli*. J.
Infect. Dis., Chicago, 137:641-4, 1978.
- 34 - FRANCO, B.D.G.M. & HOEFEL, J.L. Coliformes totais, colifor-
mes fecais e *Escherichia coli* em alfaces comercializados
em São Paulo. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 3:35-47,
1983.
- 35 - FRANK, J.F. & MARTH, E.H. Survey of soft and semisoft cheese
for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropa-
thogenic *Escherichia coli*. J. Food Prot., Ames, 41:198-
200, 1978.
- 36 - FRANTZ, J.C. & ROBERTSON, D.C. Immunological properties of
Escherichia coli heat-stable enterotoxins: development of
a radioimmunoassay specific for heat stable enterotoxins
with suckling mouse activity. Infect. Immun., Washington,
33:193-8, 1981.

- 37 - GAASTRA, W. & deGRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., Washington, 46:129-61, 1982.

- 38 - GELLI, D.S.; TACHIBANA, T.; OLIVEIRA, I.R.; ZAMBONI, C.Q.; PACHECO, J.A.; SPITERI, N. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 39:37-43, 1979.

- 39 - GIANELLA, R.A.; DRAKE, K.W.; LUTTRELL, M. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. Infect. Immun., Washington, 33:186-92, 1981.

- 40 - GLATZ, B.A. & BRUDVIG, S.A. Survey of commercially available cheese for enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food Prot., Ames, 43:395-8, 1980.

- 41 - GORBACH, S.L.; KEAN, B.H.; EVANS, D.G.; EVANS, D.J.; BESSUDO, D. Travelers' diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*. N. Engl. J. Med., Boston, 292:933-6, 1975.

- 42 - GREENBERG, H.; SACK, D.A.; RODRIGUEZ, W.; SACK, R.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Infect. Immun., Washington, 17:541-5, 1977.

- 43 - GUERRANT, R.L.; BRUNTON, L.L.; SCHNAITMAN, T.C.; REBHUN, L.I.; GILMAN, A.G. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. Immun., Washington, 10:320-7, 1974.

- 44 - GUTH, B.E.C. Escherichia coli enterotoxigênica: detecção através de características antigênicas e bioquímicas. S. Paulo. 1983. 74p. [Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina].
- 45 - GYLES, C.L. Relationship among heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., Chicago, 129:277-83, 1974.
- 46 - GYLES, C.L. & BARNUM, C.A. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. J. Infect. Dis., Chicago, 120:419-26, 1969.
- 47 - GYLES, C.L. & SANGSTER, G. An out-break of infantile gastroenteritis in Aberdeen. The association of a special type of *Bact. coli* with the infection. J. Hyg. (Camb.), 46: 1-9, 1948.
- 48 - GYLES, C.L.; SO, M.; FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., Chicago, 130:40-9, 1974.
- 49 - HALL, H.E.; BROWN, D.F. & LEWIS, K.H. Examination of market foods for coliform organisms. Appl. Microbiol., Washington, 15:1062-69, 1967.
- 50 - HEWLET, E.L.; GUERRANT, R.L.; EVANS, D.J. & GREENOUGH III, W.B. Toxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* stimulate adenyl cyclase in rat fat cells. Nature (London), 249:371-3, 1974.
- 51 - HILL, W.E. & CARLISLE, C.L. Loss of plasmid during enrichment for *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 4:1046-8, 1981.

- ✓ 52 - HOBBS, B.; THOMAS, M.E.M.; TAYLOR, J. School outbreak of gastroenteritis associated with a pathogenic paracolon bacillus. Lancet, London, 530-2, 1949.
- 53 - HONDA, T.; TAGA, Y.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., Washington, 13:1-5, 1981.
- 54 - HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B.; GUERRANT, R.L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature (London), 271:755-6, 1978.
- 55 - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. University of Toronto Press, Toronto, Canada. 2 ed. p.180.
- 56 - JACKS, T.M. & WU, B.J. Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular weight, heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., Washington, 9:342-7, 1974.
- 57 - JIWA, S.F.H.; KROVACEK, K.; WADSTROM, T. Enterotoxigenic bacteria in food and water from an ethiopian community. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 41:1010-9, 1981.
- 58 - KANTOR, H.S.; TAO, P.; GORBACH, S.L. Stimulation of intestinal adenylyl-cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin: comparison of strains from an infant and an adult with diarrhea. J. Infect. Dis., Chicago, 129:1-9, 1974.
- 59 - KAUFFMANN, F. Serology of the coli group. J. Immunol., Baltimore, 57:71-100, 1947.
- 60 - KAUFMANN, P.E. Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 42:611-4, 1981.

- 61 - KLIPSTEIN, F.A.; LEE, C.; ENGERT, R.F. Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by in vivo perfusion in rat jejunum. Infect. Immun., Washington, 14:1004-10, 1976.
- 62 - KLIPSTEIN, F.A.; ROWE, B.; ENGERT, R.F.; SHORT, A.B.; GROSS, R.J. Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. Infect. Immun., Washington, 21:171-8, 1978.
- 63 - KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., Washington, 18:775-9, 1977.
- 64 - KORNACKI, J.L. & MARTH, E. Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: a review. J. Food Prot., Ames, 45: 1051-67, 1982.
- 65 - LÁNYI, B.; SZITA, J.; RINGELHANN, B.; KOVACH, K. A waterborne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. Acta microbiol. hung., Budapest, 6: 77-84, 1959.
- 66 - LEE, J.A. & KEAN, B.H. International conference on diarrhea of travelers. New directions in research: a summary. J. Infect. Dis., Chicago, 137:355-69, 1978.
- 67 - LEITÃO, M.F.F. Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo. São Paulo, 1979. 148 p. |Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP|.
- 68 - LEVINE, M.M.; NALIN, D.R.; HORNICK, R.B.; BERGQUIST, E.J.; WATERMAN, D.H.; YOUNG, C.R.; SOTMAN, S.; ROWE, B. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heatlabile or heatstable enterotoxins and are non-invasive. Lancet, London, 1119-22, 1978.

- 69 - LEVINE, M.M.; RISTAINO, P.; SACK, R.B.; KAPER, J.B.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Colonization factor antigens I and II and type I somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*: relation to enterotoxin type. Infect. Immun., Washington, 39:889-97, 1983.
- 70 - LUMISH, R.M.; RYDER, R.W.; ANDERSON, D.C.; WELLS, J.C.; PUHR, N. Heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrhea aboard a Miami based cruise ship. Am. J. Epidemiol., Baltimore, 111:432-6, 1980.
- 71 - MANZULLO, A. & ESTEVEZ, D.J. Investigaciones de *Escherichia coli* enteropatôgeno en leches e cremas crudas de una zona de la ciudad de Buenos Aires. Rev. Asoc. Med. Argent., Buenos Aires, 79:36-41, 1965.
- 72 - MARIER, R.; WELLS, J.G.; SWANSON, R.C.; CALLAHAN, W.; MEHLMAN, I. An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* food borne disease traced to imported french cheese. Lancet, London, 1376-8, 1973.
- 73 - MATTOS, D.P. Características bioquímicas e sorológicas de amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica. São Paulo, 1979. 42 p. [Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina].
- 74 - McNEISH, A.S.; TURNER, P.; FLEMING, J.; EVANS, N. Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet, London, 946-8, 1975.
- 75 - MEHLMAN, I.; FISHBEIN, M.; GORBACH, S.L.; SANDERS, A.C.; EIDÉ, E.L.; OLSON, J. Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. J. Assn. Off. Anal. Chem., Washington, 59:67-80, 1976.

- 76 - MEHLMAN, I.J.; SANDERS, A.C.; SIMON, N.T.; OLSON, J.C. Methodology for recovery and identification of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Assn. Off. Anal. Chem., Washington, 57:101-10, 1974.
- 77 - MEHLMAN, I. & ROMERO, A. Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. Food Technol., Chicago, 36:73-9, 1982.
- 78 - MERSON, M.H. & GANGAROSA, E.J. Travelers' diarrhea. J. Am. Med. Assoc., Chicago, 234:200-1, 1975.
- 79 - MERSON, M.H.; MORRIS, G.K.; SACK, D.A.; WELLS, J.G.; FEELEY, J.C.; SACK, R.B.; GREECH, W.B.; KAPIKIAN, A.; GANGAROSA, E. Travelers' diarrhea in Mexico: a prospective study of physicians and family members attending a congress. N. Engl. J. Med., Boston, 294:1299-305, 1976.
- 80 - MERSON, M.H.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SACK, R.B.; HUQ, I.; KOSTER, F.T. Relationship between enterotoxin production and serotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., Washington, 23:325-9, 1979.
- 81 - MOON, H.W.; KOHLER, E.M.; SCHNEIDER, R.A.; WHIPP, S. c. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. Infect. Immun., Washington, 27:220-30, 1980.
- 82 - MOSELEY, S.L.; HUQ, I.; ALIM, A.R.M.A.; SO, M.; SAMADPOUR-MO TALEBI, M.; FALKOW, S. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization. J. Infect. Dis., Chicago, 142:892-8, 1980.
- 83 - MYERS, L.L. & GUINEE, P.A. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. Infect. Immun., Washington, 13:1117-9, 1976.

- 84 - NEWSOME, P.M.; BURGESS, M.N.; MULLAN, N.A. Effect of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine. Infect. Immun., Washington, 22:290-1, 1978.
- 85 - ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; EVANS, D.J.; SACK, R.B.; SACK, D.A. ; WADSTRÖM, T. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in adults and children. Med. Microbiol. Immunol., Berlin, 152:73-80, 1976.
- 86 - ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H.W.; SOJKA, W.J. The establishment of K99 antigen, previously called Kco possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Copenhagen, 83:31-36, 1975.
- 87 - OSBORNE, J.C.; MOSS, J.; FISHMAN, P.H.; NAKAYA, S.; ROBERTSON, D.C. Specificity in protein membrane associations: the interaction of gangliosides with *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and cholera toxin. Biophys. J., New York, 37:168-9, 1982.
- 88 - PARK, C.E.; TODD, E.C.D.; PURVIS, U.; LAIDLEY, R. Disease traced to cheese. Lancet, London, 172-3, 1974.
- 89 - PICKERING, L.K.; DUPONT, H.L.; EVANS, D.G.; EVANS, D.J.; OLARTE, J. Isolation of enteric pathogens from asymptomatic students from the United States and Latin America. J. Infect. Dis., Chicago, 135:1003-5, 1977.
- 90 - REIS, M.H.L.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.; MURAHOVSKY, J.; TRABULSI, L.R. Frequency of *Escherichia coli* strain producing heat-labile enterotoxin or heat-stable enterotoxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. J. Clin. Microbiol., Washington, 15:1062-4, 1982.

- 91 - REIS, M.H.L.; MATTOS, D.P.; CASTRO, A.F.P.; TOLEDO, M.R.F. ; TRABULSI, L.R. Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and source of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect.Immun., Washington, 28:24-7, 1980.
- 92 - REIS, M.H.L.; VASCONCELOS, J.C.; TRABULSI, L.R. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw foods from animal origin. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 39:270-1, 1980.
- 93 - RIEMANN, H. & BRYAN, F.L. Foodborne infections and intoxications. Academic Press, New York, 2nd ed, 1979.
- 94 - ROSENBERG, M.L.; KOPLAN, J.P.; WACHSMUTH, I.K.; WELLS, J.G.; GANGAROSA, E.; GUERRANT, R.L.; SACK, D.A. Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli* - a large waterborne outbreak. Ann. Intern. Med., Philadelphia, 86:714-8, 1977.
- 95 - SACK, R.B.; GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; JACOBS, B.; CHATTERJE, B.D. & MITRA, R.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. J. Infect. Dis., Chicago, 123:378-85, 1971.
- 96 - SACK, D.A. & SACK, R.B. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. Infect. Immun., Washington, 11:334-6, 1975.
- 97 - SACK, R.B.; SACK, D.A.; MEHLMAN, I.J.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. J. Infect. Dis., Chicago, 135:313-7, 1977.
- 98 - SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; SAITO, M. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. Japan. J. Med. Sci. Biol., Tokyo, 20:387-99, 1967.

- 99 - SATO, M.I.; SANCHEZ, P.S.; MARTINS, M.T.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. Isolation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water and sewage in São Paulo, Brazil. Rev. Microbiol., S. Paulo, enviado para publicação.
- 100 - SCHNURRENBERGER, L.W.; BECK, R. & PATE, J. Gastroenteritis attributed to imported French cheese. Morbid. Mortal. Weekly Rept., Washington, 20:427, 1971.
- 101 - SCHROEDER, S.A.; CALDWELL, J.R.; VERNON, T.M.; WHITE, P.C.; GRANGER, S.I.; BENNETT, J. A waterborne outbreak of gastroenteritis in adults associated with *Escherichia coli*. Lancet, London, 737-40, 1968.
- 102 - SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., Washington, 24:606-10, 1979.
- 103 - SERÉNY, B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., Budapest, 4:367-76, 1975.
- 104 - SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., Washington, 11:441-4, 1980.
- 105 - SMITH, H.W. & GYLES, C.L. The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *Escherichia coli* on ligated intestinal segments of rabbits and pigs. J. Med. Microbiol., Edinburgh, 3:403-9, 1970.
- 106 - SMITH, H.W. & HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 93:531-43, 1967.

- 107 - SMITH, H.W. & HALLS, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol., Elstree, 52:319-34, 1968.
- 108 - SMITH, H.W. & SACK, R.B. Immunologic cross reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., Chicago, 127:164-70, 1973.
- 109 - SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S.; KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin with VERO cells. Infect. Immun., Washington, 16:617-22, 1977.
- 110 - TAYLOR, J.; ROWELL, B.W.; WRIGHT, J. Infantile diarrhea and vomiting: a clinical and bacteriological investigation. Br. Med. J., London, 117-25, 1949.
- 111 - TJOA, W.S.; DUPONT, H.L.; SULLIVAN, P.; PICKERING, L.K.; HOLGUIN, A.H.; OLARTE, J.; EVANS, G.; EVANS, D.J. Location of food consumption and travelers' diarrhea. Am. J. Epidemiol., Baltimore, 106:61-6, 1977.
- 112 - TOLEDO, M.R.F.; FONTES, F.C.; TRABULSI, L.R. MILi - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol., S.Paulo, 13:225-30, 1982.
- 113 - TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM - uma modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol., S. Paulo, 13:309-15, 1982.
- 114 - TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. New invasive *Escherichia coli* strain. J. Clin. Microbiol., Washington, 11:422-3, 1980.

- 115 - TRABULSI, L.R. Revelação de colibacilos associados às diarreias infantis pelo método da infecção experimental da alça ligada do intestino do coelho. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo, 6:197-207, 1964.
- 116 - TRABULSI, L.R. Atualização em microbiologia clínica. Microbiologia das infecções intestinais. 1a. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981.
- 117 - TRABULSI, L.R.; FERNANDES, M.R.; ZULIANI, M.E. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo, 9:31-8, 1967.
- 118 - TRABULSI, L.R.; ZULIANI, M.E.; SERRANO, J.A. On two new enterobacteria pathogenic to the ghinea-pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo, 7:241-6, 1965.
- 119 - VELAUDAPILLAI, T.; NILES, G.R.; NAGARATNAM, W. ,Salmonelas, shigelas and enteropathogenic *Escherichia coli* in uncooked foods. J. Hyg. (Camb.), 67:187-91, 1969.
- 120 - WHO SCIENTIFIC WORKING GROUP. *Escherichia coli* diarrhea. Bull. W.H.O., Geneva, 58:23-36, 1980.
- 121 - YOLKEN, R.H.; GREENBERG, H.B.; MERSON, M.H.; SACK, R.B. ; KAPIKIAN, A.Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile-enterotoxin . J.Clin. Microbiol., Washington, 6:439-44, 1977.

RESUMO

Os objetivos desta pesquisa foram observar a incidência de E. coli enterotoxigênica (ETEC), E. coli enteropatogênica clássica (EPEC) e E. coli invasora (EIEC) em alimentos e estudar algumas de suas propriedades.

Foram estudadas 360 amostras de alimentos, de origem animal e vegetal, das quais foram isoladas 1351 cepas diferentes de E. coli. Todas foram sorotipadas para investigação daquelas pertencentes aos sorogrupos enteropatogênicos clássicos, e as cepas imóveis e lisinadescarboxilase negativas sorotipadas para identificação daquelas pertencentes aos sorogrupos invasores. A capacidade de produção das enterotoxinas LT e ST de todas as cepas de E. coli foi também investigada.

As amostras patogênicas isoladas corresponderam a 1,6 % do total de cepas de E. coli estudado. Os alimentos de onde foram isolados representaram 4,2% do total de amostras de alimentos estudados e 5,2% das amostras de alimentos contendo E. coli.

Não foram isoladas amostras de EIEC nas amostras de alimentos estudadas. As amostras de EPEC isoladas pertenceram aos sorogrupos 026 e 0125. Entre as amostras de ETEC isoladas predominaram aquelas produtoras somente da toxina LT, não tendo sido isoladas amostras capazes de produzir as toxinas LT e ST simultaneamente. Nenhuma das amostras de ETEC pertenceu aos sorogrupos enterotoxigênicos mais frequentes, nem possuiu os fatores de colonização CFA/I e CFA/II.

No teste de resistência a drogas, a maioria das amostras enteropatogênicas mostrou-se sensível às drogas utilizadas. O modelo de fermentação de açúcares foi relativamente uniforme entre estas amostras, e bastante semelhante ao apresentado pelo gênero Escherichia.

SUMMARY

The objectives of this research work were to study the incidence of enterotoxigenic E. coli (ETEC), enteropathogenic. E. coli (EPEC) and invasive E. coli (EIEC) in foods, and to study some of their properties.

360 food samples, both of animal and plant origin, were studied and 1351 different E. coli strains were isolated. All of them were serotyped in order to identify those belonging to the serogroups enteropathogenic for children (EPEC). The strains which were non-motile and lysine decarboxylase negative were serotyped for the identification of those belonging to invasive serogroups. The capacity of all strains in producing enterotoxins ST and LT was also investigated.

The isolated pathogenic strains corresponded to 1,6% of the E. coli strains tested. The foods from which they were isolated represented 4,2% of the total of food samples tested, and 5,2% of the food samples showing contamination with E. coli.

No invasive strain was observed in the food samples tested. The isolated EPEC strains belonged to serogroups 026 and 0125. There was a prevalence of enterotoxin LT only producing strains among the ETEC ones, and no strain able to produce both enterotoxins LT and ST simultaneously was observed. None of them belonged to the usual enterotoxigenic serogroups, nor had the colonization factors CFA/I and CFA/II.

The antibiotic resistance test showed that the majority of pathogenic strains were sensitive to the drugs employed. The sugar fermentation model was relatively uniform among these strains, and very similar to the one showed by the genus Escheri - chia.

DISCUSSÃO
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo