UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
Área de Bromatologia

**COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli*
ENTEROHEMORRÁGICA O157:H7 FRENTE A BACTÉRIAS
AUTÓCTONES EM CARNE BOVINA MOÍDA**

SUSANA MARTA ISAY SAAD

Tese para obtenção de grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Assoc. **Bernadette Dóra Gombossy de Melo Franco**

São Paulo
1997

Susana Marta Isay Saad

**COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA O157:H7
FRENTE A BACTÉRIAS AUTÓCTONES EM CARNE BOVINA MOÍDA**

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

São Paulo, de de 1997

Ao meu marido **Roberto**, pela sua
dedicação, colaboração e paciência, que
me deram forças para prosseguir.

Aos meus filhos **Sandra e Fabio**, por
todos os momentos de ausência durante
a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

· À Prof. **Bernadette Dóra Gombossy de Melo Franco**, pela orientação, estímulo, dedicação e amizade, sem os quais a realização deste trabalho seria impraticável

· Ao Prof. Sebastião Timóteo, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por todos os ensinamentos ao longo dos cinco anos de convivência

· Às Profs. Mariza Landgraf e Maria Teresa Destro e a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio e amizade

· À Elaine Cristina Pereira De Martinis, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo fornecimento e identificação da cepa de *Leuconostoc* spp. e pela execução e o auxílio técnico na repetição dos testes de verificação de atividade antagônica “in vitro” de bactérias lácticas contra *E. coli* O157:H7

· Ao Dr. Jerold Bushong, da 3M Microbiology Products, St. Paul, MN, EUA, pela doação dos kits Petrifilm™ kit-HEC (3M)

· Ao Prof. Luiz R. Trabulsi, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelos conhecimentos adquiridos na área de biologia molecular

· À Prof. Tânia T. Gomes, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo fornecimento da cepa

de *E. coli* O157:H7 EDL 933 e pela realização dos testes de hibridização de colônias por sondas genéticas, em cepas de *E. coli* isoladas de carne

· À Prof. Luzinete Alves da Silva, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo auxílio técnico na preparação de filtros para a hibridização de colônias

· À Prof. Lizbet K. Cordani, do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da USP, pelas orientações dadas para a análise dos dados experimentais obtidos através da estatística descritiva

· Às farmacêuticas Marta Rosângela Juncioni e Lilian Ferri Passadore, do Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP, pela identificação da cepa de *Pseudomonas putida* através do sistema VITEK (bio-Mérieux)

· Às bibliotecárias Adriana de Almeida Barreiros e Moema Rodrigues dos Santos, do Conjunto das Químicas da USP, pela realização de revisões bibliográficas e por orientações na catalogação correta das referências bibliográficas

· Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio direto ou indireto recebido durante a realização do curso de pós-graduação

· À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Estudos concedida

· À Sra. Rosa Carvalho Gamba, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo apoio e amizade

SUMÁRIO

	página
I. Introdução	1
1. Importância de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	1
2. Mecanismos de patogenicidade de <i>E. coli</i> O157:H7	2
3. Surto e casos de infecção por <i>E. coli</i> O157:H7	4
4. Ocorrência de <i>E. coli</i> O157:H7	8
5. Possível ocorrência de infecções por <i>E. coli</i> O157:H7 em países em desenvolvimento	10
6. Metodologia laboratorial para a detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos	12
7. <i>E. coli</i> O157:H7 e os microrganismos que compõe a microbiota normal de carne bovina crua	14
II. Objetivos	20
III. Materiais e Métodos	21
1. Seleção das cepas para os testes de desafio	21
1.1. Determinação da atividade antagônica de bactérias autóctones da carne <i>E. coli</i> O157:H7	21
1.2. Caracterização das cepas de <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Leuconostoc</i> spp.	23
2. Preparação da carne	24
3. Preparação das culturas	25
4. Testes de desafio	25
5. Análise das amostras	26

	página
IV. Resultados e Discussão	34
V. Conclusões	110
VI. Referências Bibliográficas	111
VII. Resumo	138
VIII. Summary	140

ÍNDICE DE FIGURAS, PROTOCOLOS E GRÁFICOS

	página
Figura 1 Teste de desafio de <i>E. coli</i> O157:H7 (inóculos: zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) com <i>E. coli</i> não patogênica (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g)	29
Figura 2 Teste de desafio de <i>E. coli</i> O157:H7 (inóculos: zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) com <i>Pseudomonas putida</i> (inóculos zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g)	30
Figura 3 Teste de desafio de <i>E. coli</i> O157:H7 (inóculos: zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g) com <i>Leuconostoc</i> spp. (inóculos: zero ou 10^6 UFC/g)	31
Protocolo 1 Procedimento para contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 no Petrifilm™Kit-HEC (3M)	32
Gráficos 1a a 1p Multiplicação de EHEC O157:H7 e <i>E. coli</i> não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g), em temperatura de refrigeração	74
Gráficos 2a a 2p Multiplicação de EHEC O157:H7 e <i>E. coli</i> não patogênica, simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g), em temperatura ambiente	77
Gráfico 3 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^6 UFC/g) na presença de <i>E. coli</i> não patogênica (inóculos zero, 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	80
Gráfico 4 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^3 UFC/g) na presença de <i>E. coli</i> não patogênica (inóculos: zero, 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	81
Gráfico 5 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^1 UFC/g) na presença de <i>E. coli</i> não patogênica (inóculos zero, 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	82
Gráficos 6a a 6l Multiplicação de EHEC O157:H7 e <i>Pseudomonas</i> spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g de EHEC e zero, 10^6 e 10^3 UFC/g de <i>Ps. putida</i>), em temperatura de refrigeração	83
Gráficos 7a a 7l Multiplicação de EHEC O157:H7 e <i>Pseudomonas</i> spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g de EHEC e zero, 10^6 e 10^3 UFC/g de <i>Ps. putida</i>), em temperatura ambiente	85
Gráfico 8 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^6 UFC/g) na presença de <i>Pseudomonas putida</i> (inóculos zero, 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	87
Gráfico 9 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^3 UFC/g) na presença de <i>Pseudomonas putida</i> (inóculos zero, 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	88

Gráfico 10 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^1 UFC/g) na presença de <i>Pseudomonas putida</i> (inóculos zero, 10^3 e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	89
Gráficos 11a a 11f Multiplicação de EHEC O157:H7 e de bactérias lácticas simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 e 10^3 UFC/g de EHEC e zero e 10^6 UFC/g de <i>Leuconostoc</i> spp.), em temperatura de refrigeração	90
Gráficos 12a a 12f Multiplicação de EHEC O157:H7 e de bactérias lácticas simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, 10^6 e 10^3 UFC/g de EHEC e zero e 10^6 UFC/g de <i>Leuconostoc</i> spp.), em temperatura ambiente	91
Gráfico 13 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^3 e 10^6 UFC/g) na presença de <i>Leuconostoc</i> spp. (inóculos zero e 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração	92
Gráficos 14a e 14b Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^6 UFC/g) sem e com a presença de <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas</i> spp. (<i>Ps. putida</i>) ou bactéria láctica (<i>Leuconostoc</i> spp.) (inóculo 10^6 UFC/g) em temperatura de refrigeração (14a) e ambiente (14b)	93
Gráficos 15a e 15b Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo 10^3 UFC/g) sem e com a presença de <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas</i> spp. (<i>Ps. putida</i>) ou bactéria láctica (<i>Leuconostoc</i> spp.) (inóculo 10^6 UFC/g) em temperatura de refrigeração (15a) e ambiente (15b)	94
Gráficos 16a e 16b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica e mantidas em refrigeração (16a) e em temperatura ambiente (16b)	95
Gráficos 17a e 17b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com <i>Pseudomonas putida</i> e mantidas em refrigeração (17a) e em temperatura ambiente (17b)	96
Gráficos 18a e 18b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com <i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (18a) e em temperatura ambiente (18b)	97
Gráficos 19a e 19b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (19a) e em temperatura ambiente (19b)	98

página

Gráfico 20 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac

Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leucostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente	99
Gráficos 21a e 21b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica e mantidas em refrigeração (21a) e em temperatura ambiente (21b)	100
Gráficos 22a e 22b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>Pseudomonas putida</i> e mantidas em refrigeração (22a) e em temperatura ambiente (22b)	101
Gráficos 23a e 23b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (23a) e em temperatura ambiente (23b)	102
Gráficos 24a e 24b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leucostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (24a) e em temperatura ambiente (24b)	103
Gráfico 25 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm TM EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leucostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente	104
Gráficos 26a e 26b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm TM EC e em Petrifilm TM Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica e mantidas em refrigeração (26a) e em temperatura ambiente (26b)	105
Gráficos 27a e 27b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm TM EC e em Petrifilm TM Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>Pseudomonas putida</i> e mantidas em refrigeração (27a) e em temperatura ambiente (27b)	106

página

Gráficos 28a e 28b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em PetrifilmTMEC e em PetrifilmTMKit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10¹, 10³ ou 10⁶ UFC/g) e com

<i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (28a) e em temperatura ambiente (28b)	107
Gráficos 29a e 29b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração (29a) e em temperatura ambiente (29b)	108
Gráfico 30 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10 ¹ , 10 ³ ou 10 ⁶ UFC/g) e com <i>E. coli</i> não patogênica, <i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Leuconostoc</i> spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente	109

I. INTRODUÇÃO

1. Importância de *Escherichia coli* O157:H7

O relato de surtos de origem alimentar tem assumido dimensões crescentes nos últimos anos, atingindo localidades e até países diferentes, como reflexo da globalização da economia e da criação de órgãos de livre comércio entre países de um mesmo continente, como é o caso do Mercado Comum Europeu, do Mercosul e da Associação de Livre Comércio das Américas (ALCA).

Escherichia coli O157:H7 passou a fazer parte das manchetes dos jornais do mundo todo, com o maior surto de origem alimentar de todos os tempos, ocorrido no Japão em meados de julho de 1996, envolvendo 6.309 crianças de 62 escolas de Sakai, com 1.012 casos confirmados laboratorialmente, incluindo 197 casos de HUS (síndrome urêmica-hemolítica) e pelo menos 3 óbitos (FUKUSHIMA et al., 1997; TAKEDA et al., 1997).

As primeiras evidências da ocorrência de infecção causada por *E.coli* pertencente ao sorotipo O157:H7 surgiram com a descrição de dois surtos ocorridos nos Estados Unidos, nos estados de Oregon e Michigan, em 1982, com 47 casos associados à ingestão de hambúrgueres de uma mesma rede de lanchonetes. Anteriormente, uma única cepa de *E.coli* O157:H7 havia sido isolada pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) em 1975, de um total de 3.000 cepas de *E.coli* sorotipadas desde 1973 (RILEY et al., 1983).

Diversas investigações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais feitas em seguida deixaram clara a importância de *E.coli* O157:H7 como agente etiológico

da colite hemorrágica transmitida por alimentos (RILEY, 1987; SACK, 1987; TARR, 1994; CULLOR, 1995; AMSTRONG et al., 1996).

E.coli O157:H7 passou a assumir um papel significativo após o surto por hambúrgueres de uma mesma rede de lanchonetes em quatro estados americanos, ocorrido de novembro de 1992 e fevereiro de 1993. O surto envolveu mais de 500 casos de infecção confirmados laboratorialmente, incluindo 41 casos de HUS e 4 óbitos (CDC, 1993a,b), com um total de mais de 600 casos só no estado de Washington, 371 dos quais eram crianças (BRANDT et al., 1994).

Em 1996, além do Japão, a Escócia foi palco de surtos de origem alimentar por *E.coli* O157:H7, um dos quais por torta de carne, com pelo menos 415 casos, incluindo 18 óbitos, e outro, por leite, com 100 pessoas envolvidas (AHMED, 1997; REILLY & CARTER, 1997).

2. Mecanismos de patogenicidade de *Escherichia coli* O157:H7

A infecção por *E.coli* O157:H7 causa basicamente dois tipos diferentes de doença, ou seja, a colite hemorrágica e a síndrome urêmica-hemolítica (HUS) (RILEY, 1987). De maneira geral, a infecção gastrointestinal causada por esse microrganismo se caracteriza por diarreia sanguinolenta. Entretanto, pode, também, ocorrer diarreia não sanguinolenta e infecção assintomática, além da HUS e da púrpura trombótica-trombocitopênica (TPP). Assim sendo, a infecção por essa bactéria tem amplo espectro clínico (HOFMANN, 1993).

Apesar de não se saber ao certo como as cepas de EHEC, particularmente aquelas pertencentes ao sorotipo O157:H7, causam a doença no homem, é sabido que *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) possui genes,

localizados em bacteriófagos, que codificam para a produção de toxinas denominadas "Shiga-like" (SLT), também denominadas verotoxinas (VT), sendo conhecidas algumas variantes, sendo que em EHEC associada a alimentos, as mais importantes são a SLT-I, também denominada VT1, e a SLT-II, também denominada VT2 (HOFMANN, 1993). Além disso, essas cepas têm a habilidade de causar lesões do tipo "attaching and effacing" na mucosa intestinal. Esses dois fatores de virulência são atualmente considerados os mais importantes em *E.coli* O157:H7 (BEUTIN et al., 1994). Com relação às adesinas, sabe-se que elas promovem a ligação firme à célula intestinal, resultando em um mecanismo que envolve a reorganização de actina (SALYERS & WHITT, 1994).

Outros fatores, como a presença de plasmídios característicos de EHEC e a produção de enterohemolisinas ocorrem em muitas cepas de EHEC, incluindo as O157:H7, mas não se sabe se elas exercem um papel significativo na sua patogenicidade (BEUTIN et al., 1994). Segundo WHITTAM et al. (1993), o sorotipo O157:H7 de *E.coli* enterohemorrágica aparenta ser uma cepa nova que primeiramente tornou-se capaz de provocar aderência do tipo "attaching-effacing" e, em seguida, adquiriu genes, codificados por bacteriófagos, para a produção de toxinas do tipo "Shiga-like".

Outros sorogrupos classificados como *E.coli* produtores de toxinas "Shiga-like" possuem a capacidade de provocar doenças no ser humano, uma vez que infecções têm sido relatadas (JOHNSON et al., 1996). Entretanto, sua importância epidemiológica e clínica é muito pequena, quando comparada à do sorogrupo O157 (HOFMANN, 1993; TARR, 1994).

Tem sido sugerido, também, que a predominância do sorogrupo O157, particularmente do sorotipo O157:H7, deve-se ao seu isolamento baseado na

sua incapacidade de fermentar sorbitol ou na sua reação negativa para a β -glicuronidase. Muitos dos outros sorotipos de *E.coli* produtores de toxinas “Shiga-like” têm outro comportamento nessas provas bioquímicas (CLARKE et al., 1989), incluindo cepas de *E.coli* O157:H⁻, fermentadoras de sorbitol, apontadas como causadoras de surtos e de casos isolados de HUS (GUNZER et al., 1992; KARCH et al., 1993). O fato é que, de maneira geral, cepas pertencentes ao sorotipo O157:H7 têm sido apontadas como causadoras de um número cada vez maior de surtos e de casos isolados.

3. Surtos e casos de infecção por *E. coli* O157:H7

RILEY (1987) enumerou cinco surtos por *E.coli* O157:H7 ocorridos nos EUA entre 1982 e 1985, após o surto de Oregon e Michigan, totalizando 171 casos. Dois desses surtos estavam associados ao consumo de hambúrgueres, um envolvendo sanduíches e dois onde o veículo da infecção não ficou estabelecido. Posteriormente, o autor citou a ocorrência de pelo menos 6 surtos adicionais até 1986. Desses, 2 ocorreram em clínicas de repouso para idosos, 2 em creches, 1 em uma base militar e 1 em um estabelecimento comunitário. Com relação aos casos esporádicos ocorridos nos EUA, RILEY (1987) citou um total de 103 pessoas com doenças compatíveis clinicamente com a colite hemorrágica, em 28 estados americanos, nos 20 meses que sucederam o surto de Oregon.

KNIGHT (1993) citou a existência de 15 relatos de infecção por O157:H7 nos EUA, com centenas de casos entre 1982 e 1993. Segundo CULLOR (1995), o número de surtos registrados nos Estados Unidos aumentou de 2 por ano de 1982 a 1992 para 17 por ano em 1993 e para 25 até outubro de 1994.

Atualmente, pelo menos 16 países, distribuídos em 6 continentes, relatam casos de infecção em humanos por *E.coli* O157:H7 ou o isolamento desse patógeno a partir de bovinos (DOYLE et al., 1997).

CAPRIOLI et al. (1992) descreveram os resultados de um estudo retrospectivo feito na Itália entre maio de 1988 e maio de 1991. Verificou-se que de 49 crianças com HUS, 37 (75%) haviam tido infecção por *E.coli* produtoras de verotoxina (VTEC). Dos 30 crianças que revelaram a presença de anticorpos anti-LPS, 25 (83%) tinham anticorpos anti-O157.

WATERS et al. (1994) relataram a ocorrência de 1.488 casos de infecção por VTEC, entre 1987 e 1991, em Alberta, no Canadá, com uma média de casos por ano de 296 a 388 entre 1987 e 1989, diminuindo para 247 em 1990 e para 200 em 1991. Os autores descreveram a ocorrência de 505 casos de infecção por VTEC, na Escócia, também entre 1987 e 1991, com um aumento de casos por ano de 12 em 1987, para 202 em 1991. Em Alberta, o veículo da infecção era desconhecido em 65,1% dos casos e 23,1% deles foram atribuídos ao consumo de carne bovina moída, enquanto que na Escócia, a maior parte dos casos foi atribuída ao consumo de hambúrgueres subcozidos.

Após o surto de Oregon e Michigan, em 1982 (RILEY et al., 1983), diversos surtos foram descritos. Entre esses surtos, dois ocorreram em clínicas de repouso no Canadá (STEWART, 1983; CARTER et al., 1987) e um nos Estados Unidos (RYAN et al., 1986), ocasionados pelo consumo de hambúrgueres e de sanduíches de presunto, peru e queijo contaminados.

Surtos por hambúrgueres de preparo caseiro foram relatados em 1993, na Califórnia (CDC 1994). Na Inglaterra, um surto e vários casos isolados associados ao consumo de carne bovina proveniente de um mesmo abatedouro

e de um açougue foram relatados por CHAPMAN et al. (1993a) e por WILLSHAW et al. (1994) e ao consumo de carnes cozidas frias, principalmente sanduíches de peru (SALMON et al., 1989), também foram descritos.

Outros produtos cárneos também têm sido associados a casos e surtos, como aquele causado por salame nos Estados Unidos, nos estados de Washington e Califórnia, com 20 casos de infecção por *E.coli* O157:H7 confirmados laboratorialmente no final de 1994 e de 6 casos adicionais, incluindo 3 casos de HUS (CDC, 1995).

O leite e seus derivados também têm sido considerados importantes veículos de O157:H7. MARTIN et al. (1986) isolaram esse sorotipo de EHEC do gado e do leite de uma fazenda onde 2 pessoas adquiriram HUS após a ingestão de leite cru contaminado. DUNCAN & CARTER (1987) relataram um surto ocorrido em uma pré-escola em Ontário, Canadá, em 1986, no qual leite não pasteurizado foi apontado como provável veículo de infecção. CHAPMAN et al. (1993b) observaram evidências epidemiológicas ligando a infecção por *E.coli* O157:H7 por um determinado grupo de pessoas ao consumo de leite cru proveniente de uma fazenda na Inglaterra. A bactéria foi isolada de uma das amostras de leite.

MORGAN et al. (1993) relataram a ocorrência de 16 casos de infecção por O157:H7, incluindo 5 casos de HUS, no noroeste da Inglaterra, em 1991, resultantes do consumo de iogurte.

Uma série de surtos diarreicos de origem alimentar por *E.coli* O157:H7 ocorreram em Oregon, EUA, causados provavelmente pelo consumo de maionese e de molhos contendo maionese, atingindo cerca de 300 clientes de

uma cadeia de restaurantes especializada em bifes e em buffet de saladas (WEAGANT et al., 1994).

Infecções por O157:H7 também têm sido associadas ao consumo de alimentos de origem vegetal. MORGAN et al. (1988) descreveram um surto ocorrido em 1985, na Inglaterra, atribuído à manipulação de batatas, possivelmente contaminadas com esterco bovino.

CIESLAK et al. (1993) identificaram 4 casos de infecção por *E.coli* O157:H7, incluindo um óbito, sendo que o primeiro caso foi atribuído ao consumo de vegetais de uma horta, adubados com fezes de animais que revelaram títulos elevados de anticorpos contra O157:H7. Os 3 casos subsequentes foram atribuídos a transmissão pessoa a pessoa. MERMIN et al. (1997) citaram a ocorrência de um surto por uma mistura de diferentes tipos de brotos de alface, em dois estados americanos. Os autores atribuíram a presença de *E.coli* O157:H7 nas alfaces à proximidade de seu cultivo e processamento a criações de gado e referiram-se ao surto como o quinto associado a alfaces ocorrido na América do Norte.

BESSER et al. (1993) descreveram um surto por *E.coli* O157:H7 ocorrido em 1991, nos Estados Unidos, com 23 casos, incluindo 5 de HUS, associado ao consumo de cidra de maçã fresca. Os autores atribuíram a ocorrência do surto à prensagem de maçãs contaminadas com material fecal proveniente do solo ou da contaminação durante a produção da cidra. GLYNN et al. (1997) citaram a ocorrência de um surto por suco de maçã não pasteurizado de uma mesma marca, envolvendo 4 estados americanos e uma província canadense, num total de 71 casos, incluindo 14 casos de HUS e um óbito.

Surtos por *E.coli* O157:H7 causados por água utilizada para consumo, abastecimento ou recreação também foram descritos (RICE et al., 1992; KEENE et al., 1994).

A literatura também revela alguns surtos por *E.coli* O157:H7 em que o veículo de contaminação inicial não foi totalmente elucidado (SPIKA et al., 1986; ROWE et al., 1994; REIDA et al., 1994; TOZZI et al., 1994).

4. Ocorrência de *E. coli* O157:H7

Os alimentos envolvidos em surtos e em casos de infecção por *E.coli* O157:H7 são predominantemente de origem animal, particularmente de origem bovina. Tendo em vista esse fato, diversos pesquisadores vêm procurando, nos últimos anos, verificar a ocorrência dessa bactéria nos alimentos de origem animal, principalmente na carne bovina. Os resultados de alguns desses estudos serão citados a seguir.

DOYLE & SCHOENI (1987) obtiveram positividade para *E.coli* O157:H7 que variou de 1,5% para carne suína e de aves a 3,7% para carne bovina moída, em Madison, EUA, e Calgary, Canadá. WILLSHAW et al. (1993) obtiveram positividade de 17% para *E.coli* produtores de VT em carne bovina moída e produtos cárneos, em Londres. SAMADPOUR et al. (1994) também obtiveram positividade de 17% para *E.coli* produtores de toxinas SLT-I e/ou SLT-II em carnes, aves e frutos do mar, em Seattle, EUA.

HEUVELINK et al. (1996) fizeram estudos de ocorrência de *E.coli* produtor de VT, em três etapas diferentes, na Holanda. Na primeira delas, utilizando o ágar Mac Conkey-sorbitol após enriquecimento seletivo em caldo TSB modificado com acriflavina, os pesquisadores isolaram *E.coli* produtor de

VT (VTEC) O157 de 0,3% das amostras de carne moída (mistura de carne bovina e suína) e de nenhuma amostra de carne moída bovina e suína e de produtos de carnes de aves. Na segunda etapa, utilizando o Petrifilm™ Kit-HEC (3M), os autores isolaram cepas de *E.coli* O157 não produtoras de VT de 6,1% das amostras de carne crua. Na terceira etapa, através da utilização de PCR a partir das culturas de enriquecimento obtidas na primeira etapa, os autores detectaram a presença de genes para VT1 e/ou VT2 de 16,1% das amostras.

Outros estudos têm procurado investigar o possível papel dos animais como reservatório desse microrganismo (SUTHIENKUL et al., 1990; CHAPMAN et al., 1993a; RASMUSSEN et al., 1993; HANCOCK et al., 1994; WANG et al., 1996). AMSTRONG et al. (1996) reuniram os diversos estudos de prevalência de *E.coli* O157:H7 em gado bovino realizados. Os autores concluíram que o patógeno pode ser isolado das fezes de animais tanto doentes como saudáveis, sendo mais comum em bezerros do que em animais mais velhos e que a sua ocorrência no gado norte americano e europeu variou de menos de 1% a quase 10%, com ampla distribuição geográfica nos EUA.

Tendo em vista os surtos ocorridos, diversos pesquisadores têm estudado o papel de outros alimentos, além da carne bovina crua, como possíveis veículos de transmissão de *E.coli* O157:H7. Assim, ABDUL-RAOUF et al. (1993b) verificaram que esse patógeno revelou capacidade de multiplicar-se em carne moída assada contendo maionese, ingredientes comumente utilizados em receitas de saladas. SCHOENI & DOYLE (1994) sugeriram que frangos seriam possíveis fontes ou veículos de transmissão de *E.coli* O157:H7, uma vez que esse patógeno revelou-se capaz de colonizar o trato intestinal desses animais, podendo, também, contaminar a superfície dos ovos.

ABDUL-RAOUF et al., (1993a) observaram que *E.coli* O157:H7 era capaz de multiplicar-se em saladas à base de vegetais crus, nas condições de processamento e armazenamento normalmente utilizadas. WEAGANT et al. (1994) salientaram a possibilidade da maionese e de outros alimentos ácidos servirem como veículos de transmissão de EHEC, quando armazenados à temperatura de refrigeração. Os autores constataram que EHEC era capaz de sobreviver em maionese inoculada por 35 dias. Cidra de maçã (MILLER & KASPAR, 1994; SEMANCHECK & GOLDEN, 1996) e frutas como melancia e melão cantalupo (DEL ROSARIO & BEUCHAT, 1995) também têm sido apontados como possíveis veículos de transmissão de *E.coli* O157:H7.

5. Possível ocorrência de infecções por *E. coli* O157:H7 em países em desenvolvimento

Em 1987, SACK sugeriu que *E.coli* O157:H7 e outras EHEC se disseminam principalmente através de alimentos processados e, por esse motivo, sua ocorrência em países de baixo índice de desenvolvimento industrial seria rara, apesar das precárias condições de higiene freqüentemente encontradas durante o preparo de alimentos.

KNIGHT (1993) sugeriu a possibilidade de haver um agrupamento geográfico dos casos e surtos de infecção por *E.coli* O157:H7, uma vez que, dos 15 surtos ocorridos até 1993 nos EUA, 7 foram em estados próximos da fronteira com o Canadá. A autora comentou que a maior positividade no gado da região para essa bactéria poderia ser devida a práticas de criação e de abate diferentes em relação a outras, que poderiam induzir a colonização do gado por EHEC e, assim, sua entrada na cadeia alimentar.

A esse respeito, AMSTRONG et al. (1996) relatou que o início da prática de utilização de antibióticos “ionóforos” para o melhor rendimento da alimentação pelo gado, com o concomitante surgimento dos primeiros surtos por *E.coli* O157:H7, levou a especulações, ainda sem evidências experimentais, de que esses compostos poderiam resultar em condições favoráveis para o desenvolvimento desse patógeno no rúmen, conseqüentes a alterações fisiológicas. Os autores relataram, também, que, por razão desconhecida, a utilização de alimentação computadorizada resultou em maior taxa de isolamento de *E.coli* O157:H7 a partir de gado.

Alguns autores consideram que a baixa ocorrência de *E.coli* O157:H7 pode ser simplesmente uma questão de percepção e conhecimento por parte dos médicos e dos laboratórios de análise da existência e importância desse patógeno. Assim, nas regiões onde *E.coli* O157:H7 é mais freqüente, há um aumento, por parte dos laboratórios clínicos, do uso de meio de isolamento apropriado, o ágar Mac Conkey-sorbitol. Ao mesmo tempo, nessas regiões, os médicos estão mais atentos à colite hemorrágica (KNIGHT, 1993; TARR, 1994).

Alguns relatos sobre a ocorrência de infecções por *E.coli* O157:H7 e sobre a sua presença em alimentos em países em desenvolvimento são conhecidos. Assim, LOPEZ et al. (1989) relataram que, embora a Argentina seja um dos países com maior frequência de HUS do mundo, com estimativas chegando a 250 casos por ano, *E.coli* O157:H7 não é um patógeno usual em casos de HUS e de diarreia nesse país. Os pesquisadores isolaram a bactéria das fezes de um (2%) entre 51 pacientes com HUS e de 2 (4%) de 44 indivíduos com diarreia. Por outro lado, a frequência de diarreia associada à produção de toxina "Shiga-like" nesse estudo revelou-se bastante alta.

CONTRINI et al. (1997) atribuíram a alta frequência de casos de HUS na Argentina à grande ocorrência de *E.coli* produtor de SLT_a nos casos de diarreia sanguinolenta (38,9%). Sua presença foi detectada em 31,5% das amostras de fezes de gado e em 22,7% das amostras de carne pesquisadas. Os autores salientaram o papel dos animais como fonte de EHEC na Argentina.

CORDOVÉZ et al. (1992) relataram que, no Chile, 20 crianças com menos de 4 anos de idade foram internadas com HUS entre março de 1988 e março de 1989, nas cidades de Santiago, Valdivia e Temuco. Desses 20 casos de HUS, 6 (30%) revelaram a presença de EHEC nas fezes. O sorogrupo O157 foi detectado em 3 de 8 pacientes estudados pelos autores.

SUTHIENKUL et al. (1990) isolaram *E.coli* produtor de SLT de 9% das amostras de carne bovina comercializada no varejo de Bangkok, de 8% a 28% de carne bovina fresca em abatedouros e de 11% a 84% das amostras de fezes bovinas na Tailândia. Entretanto, nenhuma das 106 cepas de *E.coli* isoladas aglutinavam com anti-soro específico contra o sorogrupo O157.

6. Metodologia laboratorial para a detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos

De maneira geral, os métodos de isolamento e detecção de *E.coli* O157:H7 são distribuídos em três categorias (KIM & DOYLE, 1992). A primeira delas é caracterizada pela utilização de propriedades bioquímicas bastante específicas dessa bactéria, como a não fermentação do sorbitol e a ausência de atividade β -glicuronidásica (SZABO et al., 1986; ABDUL-RAOUF et al., 1993b).

A segunda é baseada em técnicas de biologia molecular, com o uso de sondas genéticas (LEVINE et al., 1987; NEWLAND & NEILL, 1988; BELL et al., 1994) ou de PCR (POLLARD et al., 1990; GANNON et al., 1992; GANNON et al., 1993; FRAMPTON & RESTAINO, 1993; DENG & FRATAMICO, 1996).

Essas técnicas permitem a detecção dos genes relacionados com a produção de verotoxinas.

A terceira e última categoria envolve a utilização de técnicas imunológicas com anticorpos contra verotoxinas ou contra o antígeno O157 (TODD et al., 1988; OKREND et al., 1990b; PADHYE & DOYLE, 1991a,b; KIM & DOYLE 1992; MILLEY & SEKLA, 1993; TORTORELLO & STEWART, 1994; JOHNSON et al., 1995; HUANG & CHANG, 1996; RESTAINO et al., 1996).

Alguns meios de enriquecimento seletivo têm sido propostos no sentido de reprimir a microbiota competitiva presente. Esses meios incluem o caldo HC (colite hemorrágica), caldo tripticase-soja (TSB) modificado, suplementado com novobiocina ou acriflavina, caldo *E.coli* (EC) modificado, suplementado com novobiocina, água peptonada tamponada suplementada com vancomicina, cefsulodina e cefixima (SZABO et al., 1986; DOYLE & SCHOENI, 1987; KIM & DOYLE, 1992; OKREND et al., 1990a; CHAPMAN et al., 1993a). A adição da enzima oxirase no caldo de enriquecimento (PHEBUS et al., 1993) e o enriquecimento secundário para *E.coli* O157 com a utilização de separação imunomagnética (WEAGANT et al., 1995; RESTAINO et al., 1996) também têm sido propostos.

O meio para o isolamento seletivo de *E.coli* O157:H7 mais amplamente utilizado, tanto para a análise de amostras clínicas quanto de amostras de alimentos, é o ágar MacConkey-sorbitol, proposto por MARCH & RATNAM (1986). Esse ágar passou a ser utilizado como meio diferencial, baseado em uma característica peculiar das cepas de *E.coli* O157:H7, ou seja, incapacidade de fermentar sorbitol em 24 horas, ao contrário do que ocorre com a maioria das outras cepas de *E.coli*.

Atualmente, existem no mercado diversos sistemas rápidos para triagem de *E.coli* O157:H7 em alimentos, que dão resultados em tempo significativamente inferior ao dos métodos de cultivo mencionados. Entre esses sistemas, destaca-se o Petrifilm™ Kit-HEC (3M do Brasil), baseado na inoculação da cultura de enriquecimento em Petrifilm para *E.coli* (PEC) e

incubação, com posterior detecção através de discos reativos contendo anticorpos, por meio de ensaio do tipo ELISA. O procedimento revelou-se confiável e eficiente, com resultados presuntivos em 26-28 horas (OKREND et al., 1990b).

7. *E. coli* O157:H7 e os microrganismos que compõe a microbiota normal de carne bovina crua

No Brasil, não se tem conhecimento até o presente momento, de nenhum surto ou caso de infecção por *E.coli* O157:H7 envolvendo alimentos. É somente conhecido o isolamento desse patógeno de dois bezerros de fazendas diferentes do Rio de Janeiro (CERQUEIRA et al., 1997). Em um estudo realizado em São Paulo, foi detectada a presença de *E.coli* produtora de SLT nas fezes de 2 (0,4%) crianças com diarreia. O estudo, realizado entre abril de 1989 e março de 1990, pesquisou 505 crianças com diarreia e o mesmo número de crianças saudáveis, todas com idades entre 1 e 5 anos. Entretanto, as cepas de *E.coli*, que se revelaram SLT+ por meio de hibridização por sondas genéticas, não eram pertencentes ao sorogrupo O157 (GOMES et al., 1994). Em levantamento feito pelo nosso grupo de pesquisa em 1995 (dados não publicados), 50 amostras de carne moída, adquiridas em pontos de venda diferentes, localizados em diversos bairros da cidade de São Paulo, não revelaram a presença desse patógeno. Anteriormente, FRANCO et al. (1991) relataram a ocorrência de apenas uma cepa de *E.coli* SLT-I e/ou SLT-II entre 306 tipadas, provenientes de 96 amostras de alimentos. Essa cepa pertenceu ao sorogrupo O15.

Uma hipótese possível para a baixa ocorrência de *E.coli* O157:H7 em alimentos, particularmente na carne crua, seria a atividade antagônica expressa

pelos demais microrganismos presentes, interferindo na capacidade do patógeno sobreviver. No caso de *Pseudomonas* spp., a atividade antimicrobiana de determinadas cepas tem sido relatada (GRAM, 1993; CHAMPOMIER-VERGÈS & RICHARD, 1994). CHENG et al. (1995) observaram efeito antimicrobiano de cepas de *Pseudomonas* spp. sobre *E.coli* O157:H7 e sobre algumas outras bactérias patogênicas, aparentemente devido à produção de sideróforos.

Já a produção de compostos com atividade antimicrobiana por cepas de bactérias lácticas é amplamente conhecida (KIM, 1993; STILES, 1994; JACK et al., 1995; SCHILLINGER et al., 1996; MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997). Apesar do efeito inibitório por parte de bactérias lácticas ser normalmente descrito contra bactérias Gram positivas, em determinadas condições bactérias Gram negativas podem ser também inibidas (STEVENS et al., 1992; KALCHAYANAND et al., 1992; RODRIGUEZ et al., 1994; CUTTER & SIRAGUSA, 1995).

A microbiota presente na carne é resultante dos nódulos linfáticos e do trato intestinal do próprio animal e conseqüente de contaminação externa, como por exemplo, a causada pelas facas utilizadas na sangria do animal e no corte da carne, pelo ambiente ou pelas mãos do manipulador (JAY, 1992). *Pseudomonas* spp., *E.coli* e outras enterobacteriáceas e bactérias lácticas, além de *Brochothrix thermosphacta*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxela* e *Aeromonas*, são frequentemente apontadas como bactérias predominantes na carne bovina, podendo causar sua deterioração (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1980; SILVA Jr., 1985; JAY, 1992; JACKSON et al., 1997).

Determinados parâmetros, como a pressão parcial de oxigênio e de gás carbônico e a temperatura influenciam na composição da microbiota da carne (DROSINOS & BOARD, 1995a). No caso específico da carne bovina armazenada sob aerobiose à temperatura de refrigeração, a deterioração bacteriana é causada predominantemente por microrganismos psicrotróficos Gram negativos. Nessa microbiota predominam microrganismos do gênero *Pseudomonas* (GARCÍA de FERNANDO, 1995; BORCH et al., 1996). Esses microrganismos, típicos do solo e da água, são apontados como os principais causadores de deterioração de alimentos frescos refrigerados, devido à natureza psicrotrófica de muitas espécies e cepas. Algumas delas são produtoras de pigmentos azul-esverdeados hidrossolúveis (JAY, 1992). Por outro lado, embalagens com filmes impermeáveis ao oxigênio propiciam o desenvolvimento de bactérias microaerófilas, como *Lactobacillus* ou *Brochothrix thermosphacta* (JOHNSTON & TOMPKIN, 1992).

O domínio de *Pseudomonas* spp. em determinados tipos de alimentos frente às outras bactérias ocorre como consequência da sua capacidade de crescimento rápido sob determinadas condições, como alta atividade de água, pH neutro, temperatura e suprimento de oxigênio adequados, embora esses microrganismos muitas vezes estejam em minoria em termos da microbiota total no início da vida de prateleira desses alimentos (JEPPESEN, 1995). No caso específico da carne, o comportamento altamente oxidativo das bactérias do gênero *Pseudomonas* faz com que esses microrganismos sejam capazes de utilizar compostos nitrogenados de baixo peso molecular como fontes de energia. Esse fato tem como principal consequência uma vantagem em relação às outras bactérias, em termos de competição. Ocorre que as carnes contêm

baixos níveis de açúcares simples, e fontes de energia mais complexos, como proteínas e gorduras só são aproveitados pelas bactérias presentes durante a deterioração da carne. Nessa etapa, os microrganismos já estão presentes em número muito elevado (JACKSON et al., 1997).

Diferentes espécies de *Pseudomonas* apresentam diferenças de comportamento na carne. Assim, em carne de cordeiro moída, a predominância de *Ps. fluorescens* na carne fresca e de *Ps. fragi* após armazenamento em refrigeração foi observada. Essa diferença foi atribuída à maior versatilidade metabólica de *Ps. fragi* em relação às outras cepas de *Pseudomonas* spp. de carne (DROSINOS & BOARD, 1995b).

As bactérias láticas, por sua vez, representadas pelos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, contribuem na conservação de alimentos naturalmente ou por fermentação induzida (KIM, 1993; STILES, 1994). Carnes frescas freqüentemente contêm bactérias láticas como parte de sua microbiota natural. A introdução de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas em carnes frescas tem o potencial de deter ou impedir a sua deterioração e inibir o crescimento ou até resultar na morte de bactérias patogênicas presentes, como *Listeria monocytogenes* (ECKNER, 1992).

As bactérias láticas predominam em carne fresca mantida sob vácuo e sob atmosfera modificada, favorecidas pelo seu metabolismo fermentativo e pela sua capacidade de multiplicar rapidamente nas faixas de pH encontradas na carne (JACKSON et al., 1997). Além disso, bactérias láticas crescem bem em condições de aerobiose e predominam em cortes de carne do varejo, após

armazenamento dos cortes primários em atmosfera controlada por tempo prolongado (LEISNER et al., 1995).

De fato, outros estudos revelaram que o armazenamento prolongado em atmosfera modificada seguido de armazenamento em aerobiose favoreceu o crescimento de bactérias lácticas e de *Enterobacteriaceae*, em detrimento do rápido crescimento de *Pseudomonas* spp. A temperatura de armazenamento também afetou, não só o crescimento, mas também a microbiota presente (BORCH et al., 1996).

Entretanto, ao contrário do que ocorre com *Pseudomonas* spp. e bactérias lácticas, que são microrganismos inerentes da carne, a presença de *E.coli* ocorre com frequência em tecidos frescos, em consequência à contaminação por fezes do animal ou à contaminação externa (JACKSON et al., 1997).

E.coli é a espécie bacteriana predominante entre os microrganismos presentes na flora intestinal anaeróbia facultativa de animais de sangue quente (DOYLE & PADHYE, 1989). Muitos tipos de *E.coli* são inofensivos, podendo inclusive trazer benefícios ao hospedeiro por suprimirem o desenvolvimento de bactérias prejudiciais no trato intestinal (DUNCAN et al., 1994). Aliado a esse fato, determinadas cepas de *E.coli* possuem a capacidade de sintetizar colicinas (Van der Wal, 1995).

A distribuição de *E.coli* no ambiente está diretamente relacionada à sua presença no intestino dos homens e dos animais (DOYLE & PADHYE, 1989). Assim sendo, a manipulação pode resultar na contaminação cruzada de carnes, as quais também podem ser contaminadas através da contaminação do próprio ambiente. A evisceração também resulta na introdução de microrganismos

presentes no conteúdo intestinal na carne. Essa contaminação ocorre principalmente quando há perfuração do trato intestinal e quando ocorre penetração do conteúdo intestinal no reto, durante a remoção do conteúdo abdominal (JACKSON et al., 1997).

Em ecossistemas naturais como a carne, a interação entre bactérias é importante. Diversos tipos de interações podem ocorrer, entre eles, a competição por nutrientes, a produção de substâncias antimicrobianas como o peróxido de hidrogênio, o ácido láctico e bacteriocinas. Essas interações selecionam as bactérias que se multiplicam. Dessa maneira, tem sido proposto que determinadas bactérias sejam utilizadas no sentido de retardar a deterioração causada por outras bactérias, atuando como culturas protetoras (BORCH et al., 1996).

II. OBJETIVOS

Com base no risco que a presença de *E.coli* O157:H7 em carne bovina pode representar à saúde do consumidor, este trabalho teve por principal objetivo verificar a capacidade de sobrevivência desse patógeno em carne moída frente a outras bactérias que fazem parte da microbiota normal de carne bovina, particularmente *E.coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* e *Leuconostoc* spp., através de testes de desafio (“challenge tests”). Pretendeu-se, também, verificar a influência da temperatura de armazenamento da carne na capacidade de *E.coli* O157:H7 sobreviver frente aos demais microrganismos. Paralelamente, pretendeu-se avaliar o desempenho de um kit comercial (Petrifilm™ Kit-HEC, 3M) para a detecção de *E.coli* O157:H7 em alimentos, trabalhando-se com carnes artificialmente contaminadas contendo outros microrganismos acompanhantes e comparar os resultados com os obtidos pelo método convencional de plaqueamento em ágar MacConkey-sorbitol segundo MARCH & RATNAM (1986).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Seleção das cepas para os testes de desafio

Os testes de desafio foram realizados com a cepa de *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933, isolada de surto por hambúrguer (O'BRIEN et al., 1993) e gentilmente cedida pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, e com três bactérias que fazem parte da microbiota de carne bovina, ou seja, *Escherichia coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* e *Leuconostoc* spp. Essas bactérias foram isoladas de produtos cárneos comercializados em São Paulo. As cepas de *Ps. putida* e de *Leuconostoc* spp. foram selecionadas com base em seu efeito antagônico contra *E.coli* O157:H7 observado em ágar (“in vitro”), conforme será descrito no próximo item.

1.1. Determinação da atividade antagônica de bactérias autóctones da carne contra *E. coli* O157:H7

Diversas cepas de bactérias lácticas, isoladas de carne foram submetidas ao teste de inibição por bacteriocinas através do método “spot on the lawn” (LEWUS et al., 1991). Para a realização desse teste, as bactérias lácticas foram cultivadas em caldo MRS (Oxoid) a 30°C por 24 horas e 2 µL desse cultivo foram depositados sobre a superfície de ágar tripticase-soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). Após incubação a 30°C por 24 horas, em condições de anaerobiose (sistema de anaerobiose Anaerogen, Oxoid), uma sobrecamada de ágar infusão cérebro-coração semi-sólido (caldo BHI, Difco + 1,0% ágar-ágar, Difco), contendo cerca de 10⁵ a 10⁶ UFC/g de *E.coli* O157:H7, foi transferida para a superfície do ágar TSAYE com o crescimento da bactéria láctica teste. Após solidificação da sobrecamada contendo *E.coli* O157:H7, foram feitas três cavidades, onde foram depositadas as enzimas protease (*Streptomyces griseus*, tipo XIV), α -quimiotripsina (pâncreas bovino, tipo II) e água (controle). A incubação foi feita por 24 horas a

30°C, em condições de anaerobiose (sistema de anaerobiose Anaerogen, Oxoid).

Uma das cepas de bactéria láctica, que posteriormente foi identificada como *Leuconostoc* spp. revelou atividade inibitória contra *E.coli* O157:H7, indicada pela presença de um halo em torno da colônia. A atividade inibitória não foi alterada na presença das enzimas protease e α -quimiotripsina. Assim sendo, a cepa de *Leuconostoc* spp. foi caracterizada como produtora de um composto inibidor de *E.coli* O157:H7 de natureza não protéica, não se tratando, portanto, de uma bacteriocina.

Um total de quinze cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de carne moída, foram testadas para a verificação de efeito inibitório sobre *E.coli* O157:H7, segundo o método descrito por CHENG et al. (1995). Para a realização desse teste, as cepas de *Pseudomonas* spp. foram cultivadas por duas vezes consecutivas em caldo tripticase-soja (TSB, Oxoid), com incubação a 30°C, por 24 horas. Em seguida, 10 μ L desse cultivo foram depositados sobre a superfície de ágar Mueller-Hinton (Difco) e as placas incubadas a 30°C, por 48 horas. Após a remoção do excesso de crescimento, as células remanescentes foram mortas por exposição a vapor de clorofórmio por 2 horas.

E.coli O157:H7 foi cultivada por duas vezes consecutivas em caldo TSB, com incubação a 35°-37°C, por 18-24 horas. Após as 18-24 horas finais de cultivo, um volume adequado do caldo foi transferido para caldo MRS (Oxoid) morno contendo 0,7% de ágar, de modo a obter uma concentração final de bactérias ao redor de 10⁶ UFC/mL. Cerca de 3 mL desse ágar MRS ainda morno foram depositados sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton, após evaporação do excesso de clorofórmio. O efeito inibitório das cepas de *Pseudomonas* spp. sobre *E.coli* O157:H7 foi verificado após incubação a 35°-37°C por 48 horas.

Do total de 15 cepas de *Pseudomonas* spp. testadas, três revelaram efeito inibitório contra *E.coli* O157:H7, selecionando-se então a cepa de *Pseudomonas* spp. que revelou efeito inibitório mais saliente, ou seja, o

maior halo de inibição, halo este que foi reproduzido nas diversas vezes em que o teste foi repetido.

1.2. Caracterização das cepas de *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. e *Leuconostoc* spp.

A cepa de *E.coli* não O157 foi considerada como não patogênica, após ter sido submetida a testes de hibridização de colônias por sondas genéticas. As seguintes sondas genéticas foram utilizadas:

- EAF (EPEC adherence factor), correspondente a um fragmento *Bam*HI-*Sal*I de 1 kb do plasmídio pMAR2 (NATARO et al., 1985);
- *eaeA* (*E.coli* attaching and effacing gene), correspondente a um fragmento *Sal*I-*Kpn*I de 1 kb do plasmídio pCVD434 (JERSE et al., 1990);
- *daaC* (diffuse adherence factor), correspondente a um fragmento *Pst*II de 390 pb do plasmídio pSLM852 (BILGE et al., 1989);
- AA (aggregative adherence factor), correspondente a um fragmento *Eco*RI-*Pst*II de 1 kb do plasmídio pCVD432 (BAUDRY et al., 1990);
- SLT-I (Shiga-like toxin gene I), correspondente a um fragmento *Taq*I-*Hinc*II de 1,142 pb do plasmídio pJN37-19 (NEWLAND & NEILL, 1988);
- SLT-II (Shiga-like toxin gene II), correspondente a um fragmento *Sma*I-*Pst*II de 842 pb do plasmídio pNN111-19 (NEWLAND & NEILL, 1988);
- EHEC (enterohemorrhagic *E.coli* adherence factor), correspondente a um fragmento *Hind*III de 3,4 kb do plasmídio pCVD419 (LEVINE et al., 1987).

Outras sondas genéticas não puderam ser utilizadas. Os testes de hibridização de colônias foram feitos no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, conforme descrito por MAAS (1983).

A cepa de *Pseudomonas* spp. isolada de carne, selecionada conforme descrito em 1.1, foi identificada como *Pseudomonas putida*. A identificação da espécie foi feita no Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, através do sistema VITEK (bio-Mérieux).

A cepa de bactéria láctica isolada de lingüiça foi identificada como *Leuconostoc* spp., segundo testes descritos por SCHILLINGER & LÜCKE (1987), ou seja, utilização de arabinose, celobiose, esculina, galactose, gluconato, glicerol, lactose, maltose, manitol, melezitose, melobiose, rafinose, ramnose, ribose, salicina, sorbitol, sacarose, trehalose, xilose, produção de gás a partir da glicose, produção de NH_3 a partir de arginina, crescimento a 8°C, 15°C e 45°C, crescimento em pH 3,9, crescimento na presença de NaCl a 6,5%, 7,0% e 10%, formação de limo a partir de sacarose, prova de Voges-Proskauer, coloração de Gram e prova da catalase.

2. Preparação da carne

Os testes de desafio foram realizados com carne bovina “de primeira” (patinho ou lagarto), adquirida no comércio em estabelecimentos aparentemente com boas condições de higiene. Cada grupo de testes de desafio, ou seja, testes de desafio de *E.coli* O157:H7 com *E.coli* não patogênica, com *Ps.putida* e com *Leuconostoc* spp., foi realizado com um lote diferente de carne bovina.

A carne foi transportada ao laboratório e, trabalhando-se em condições de assepsia, camadas externas em contato com o ar foram removidas. A carne foi moída em moedor cujas partes em contato com a carne haviam sido esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 minutos, repartida em porções iguais de 25 g e acondicionada em sacos plásticos. A carne foi mantida a cerca de -20°C até o momento de uso, quando, então, as porções foram descongeladas na geladeira.

3. Preparação das culturas

As cepas de *E.coli* O157:H7 e de *E.coli* não patogênica foram cultivadas em caldo TSB (Oxoid) a 35°-37°C por 18-24 horas ou pelo tempo necessário para a obtenção de leitura espectrofotométrica correspondente a 10^8 - 10^9 UFC/mL, previamente estabelecida em uma curva de calibração. As cepas de

Pseudomonas putida e de *Leuconostoc* spp. foram cultivadas em caldo TSB (Oxoid) a 25°C e em caldo MRS (Oxoid) a 30°C, respectivamente, por 24 horas ou pelo tempo necessário para a obtenção de leitura espectrofotométrica correspondente a cerca de 10^8 UFC/mL, também estabelecida em uma curva de calibração. Diluições decimais dessas culturas foram feitas em água peptonada 0,1% estéril. Alíquotas de cada uma dessas diluições foram plaqueadas em ágar TSA (Oxoid) e, no caso de *Leuconostoc* spp., em ágar MRS (caldo MRS, Oxoid + 1,5% ágar-ágar, Difco) para a determinação exata do número de UFC/mL.

4. Testes de desafio

Alíquotas de 2,5 mL das diluições decimais feitas a partir do cultivo de *E.coli* O157:H7 em TSB, conforme descrito no item 3, foram inoculadas em porções de 25 g de carne moída mantidas nos mesmos sacos plásticos onde haviam sido acondicionadas (item 2). Em seguida, alíquotas de 2,5 mL das diluições decimais feitas a partir dos cultivos da bactéria desafiante, ou seja, *E.coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leuconostoc* spp., também feitas conforme descrito no item 3, foram adicionadas às mesmas porções de carne. A escolha da diluição decimal empregada na inoculação de cada amostra foi feita de modo a obter diferentes combinações de inóculos de *E.coli* O157:H7 com inóculos de cada uma das outras três bactérias desafiantes, nos diversos experimentos. O desafio foi feito com cada um desses microrganismos separadamente, da seguinte maneira:

- *E.coli* O157:H7 (zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) + *E.coli* não patogênica (zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g);
- *E.coli* O157:H7 (zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) + *Pseudomonas putida* (zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g);
- *E.coli* O157:H7 (zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g) + *Leuconostoc* spp. (zero ou 10^6 UFC/g).

Controles negativos, compostos por carne não inoculada e por carne com apenas cada uma das bactérias utilizadas no teste de desafio, nas diferentes concentrações, foram empregados. Após a adição dos microrganismos, a carne foi homogeneizada no saco plástico, através de massagem manual. Em seguida, as amostras de carne inoculadas foram mantidas em temperatura de refrigeração (cerca de 8,5°C), fazendo-se a análise dessas amostras após 24, 48, 72 e 96 horas e em temperatura ambiente (cerca de 25°C), com a análise tendo sido feita após 24 e 48 horas.

O pH da carne foi monitorado durante todos os experimentos, utilizando-se uma fita indicadora de pH na primeira diluição da amostra. A temperatura de armazenamento das amostras foi monitorada em todas as etapas, através de termômetros de máxima e mínima. Em caso de resultados duvidosos ou de difícil interpretação, o experimento em questão foi repetido.

5. Análise das amostras

Cada amostra de carne (25 g) foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “stomacher” (Seward Medical Ltd.). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para os seguintes meios, de acordo com o microrganismo a ser enumerado:

- ágar Mac Conkey-sorbitol (Difco), com incubação a 35°-37°C por 18-24 horas, para a contagem de *E.coli* O157:H7 (colônias sorbitol negativas) e de *E.coli* não patogênica (colônias sorbitol positivas)
- ágar cefaloridina-fucidina-cetrimida (ágar CFC - base para ágar *Pseudomonas*, Oxoid adicionada de suplemento seletivo para ágar CFC, Oxoid), com incubação a 25°C por 48 horas, para a contagem de *Pseudomonas* spp.
- ágar MRS (caldo MRS, Oxoid + 1,5% ágar-ágar, Difco), com incubação a 30°C por 48 horas, para a contagem de bactérias lácticas.

A identificação das colônias suspeitas de *E.coli* O157:H7 no ágar MacConkey-sorbitol foi feita através de testes bioquímicos e sorológicos adequados (EWING, 1986; TOLEDO et al., 1982a,b).

Paralelamente, a contagem de *E.coli* O157:H7 e de *E.coli* não patogênica foi feita também em placas Petrifilm™ para *E.coli*, denominadas Petrifilm™EC (3M do Brasil Ltda.), com incubação a 35°-37°C, por 18-24 horas. Essas placas constituem-se de cartões de papel quadriculado, revestido de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e geis hidrossolúveis a frio. As placas Petrifilm™ apresentam, ainda, um filme plástico superior transparente, revestido internamente de agentes gelificantes hidrossolúveis a frio e um corante indicador. Para inocular a amostra em teste, é necessário diluí-la em solução aquosa apropriada, levantar o filme plástico superior da placa Petrifilm™, inocular 1 mL da amostra, voltar este filme para sua posição original, aplicar um difusor plástico para distribuir a amostra uniformemente pela placa e aguardar a solidificação do gel (1 min.). A água de diluição contida na amostra, em contato com os componentes da placa Petrifilm™, provoca a rehidratação dos nutrientes e a gelificação da mistura. As placas são incubadas e as colônias formadas são contadas. No caso específico das placas Petrifilm™EC, as colônias típicas de *E.coli* apresentam coloração azul devido a sua atividade glicuronidásica, e apresentam bolhas de gás devido à fermentação da lactose. As colônias dos demais coliformes apresentam coloração vermelha, com gás.

Por ser glicuronidase negativa, *E.coli* O157:H7 forma colônias vermelhas, com gás. Para a identificação de *E.coli* O157:H7, utilizou-se o Petrifilm™ kit-HEC (3M do Brasil Ltda.). A identificação de *E.coli* O157:H7 nesse kit está baseada em um teste imunoenzimático que utiliza um disco reativo contendo anticorpos anti-O157. As colônias crescidas no Petrifilm™EC são transferidas para o disco através da aplicação desse disco sobre a superfície do gel. Em seguida, adiciona-se o conjugado e, após lavagens adequadas, a reação é revelada pela adição de um substrato, que é convertido pela enzima do conjugado em um composto de coloração escura, que resulta na formação de manchas

permanentes no disco reativo. Cada mancha corresponde a uma colônia presuntiva de *E.coli* O157. Para a realização desse ensaio, utilizou-se a metodologia recomendada pelo fabricante, segundo protocolo anexo (protocolo 1).

As figuras 1, 2 e 3 representam as principais etapas envolvidas nos testes de desafio de *E.coli* O157:H7 com *E.coli* não patogênica, com *Pseudomonas putida* e com *Leuconostoc* spp., respectivamente.

* ágar MCS = ágar Mac Conkey-sorbitol (Difco)

Figura 1 Teste de desafio de *E. coli* O157:H7 (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) com *E. coli* não patogênica (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g).

* ágar MCS = ágar Mac Conkey-sorbitol (Difco)

** ágar CFC = ágar cefaloridina-fucidina-cetrimida (Oxoid)

Figura 2 Teste de desafio de *E. coli* O157:H7 (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) com *Pseudomonas putida* (inóculos zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g).

* ágar MCS = ágar Mac Conkey-sorbitol (Difco)

** ágar MRS = caldo MRS (Oxoid) + 1,5% ágar-ágar (Difco)

Figura 3 Teste de desafio de *E. coli* O157:H7 (inóculos zero, 10^3 ou 10^6 UFC/g) com *Leuconostoc* spp. (inóculos zero ou 10^6 UFC/g).

Protocolo 1 Procedimento para contagem de *E. coli* O157:H7 no Petrifilm™ Kit-HEC (3M).

- 1) Plaqueamento do Petrifilm™EC e incubação por 35°-37°C por 18-24 horas.
- 2) Separação dos discos dos espaçadores.
- 3) Marcação dos discos com um lápis (lado marcado = verso).
- 4) Preparação da solução de lavagem: diluição de 10,4 mL da solução-mãe a 250 mL (volume final) com água destilada (total = 125 mL da solução-mãe a 3 L).
- 5) Transferência de solução de lavagem para um bequer de 250 mL em $\pm \frac{1}{4}$ do volume e adição de um espaçador.
- 6) Separação dos filmes superiores dos Petrifilms™EC com crescimento - dobrados para trás - gel normalmente removido junto (caso contrário, disco reativo colocado sobre o gel).
- 7) Remoção do gel remanescente com um papel-toalha.
- 8) Depósito do disco reativo na cavidade, com o lado marcado para baixo, com auxílio de uma pinça.
- 9) Marcação de 3 linhas de orientação com um lápis (do disco reativo à parte de espuma do Petrifilm).
- 10) Depósito cuidadoso do filme superior do Petrifilm™EC sobre o disco reativo, evitando bolhas de ar, sem pressionar.
- 11) Remoção do disco reativo imediatamente ou após contato por até 10 minutos.
- 12) Remoção do filme superior do Petrifilm™EC e remoção, com uma pinça, do disco reativo do gel e depósito desse disco, com a parte da frente para baixo, sobre o espaçador, dentro do bequer contendo a solução de lavagem.
- 13) Discos reativos-espaçadores (máximo = 20 discos) alternados dentro do bequer.

Protocolo 1 (continuação) Procedimento para contagem de *E. coli* O157:H7 no Petrifilm™ Kit-HEC (3M).

14) Solução no bequer agitada e despejada, prendendo os discos com uma pinça.

15) Repetição da lavagem por 2 ou mais vezes, até remoção do excesso de gel que pode estar aderido nos discos.

16) Remoção da solução de lavagem, deixando os discos no bequer. Adição de 4mL, por disco, de solução de lavagem fresca e 4 µl, por disco, de conjugado. Incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação.

17) Remoção da solução de conjugado. Adição de solução de lavagem (± 5 mL/disco), agitação; despejada posteriormente. Repetição da lavagem 2 vezes, para remoção de todo o conjugado das laterais do bequer (o conjugado pode reduzir a sensibilidade).

18) Adição de 2 mL de substrato, por disco, no bequer. Incubação por, pelo menos, 20 minutos à temperatura ambiente, sob agitação.

19) Adição de água de torneira fria à solução do substrato, a fim de finalizar a reação. Agitação. Água despejada e remoção dos discos reativos do bequer.

20) Espalhamento dos discos sobre papel-toalha para secagem.

21) Observação da presença e contagem das manchas cinzas ou acinzentadas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos **1a a 1p**, **2a a 2p**, **6a a 6l**, **7a a 7l**, **11a a 11f** e **12a a 12f** representam as curvas de multiplicação, em carne bovina moída, de *E.coli* O157:H7 e de cada uma das outras bactérias utilizadas nos diferentes testes de desafio (*E.coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. e *Leuconostoc* spp.), nas diversas combinações de inóculos. Apesar de dois métodos terem sido empregados na enumeração de EHEC O157:H7, os valores das contagens expressos nestes gráficos são os obtidos através do Petrifilm™ Kit-HEC. A escolha dessa metodologia para a tabulação dos resultados deve-se ao alto índice de correlação observado entre as contagens obtidas pelo Petrifilm™ Kit-HEC e as observadas no ágar MacConkey-sorbitol, conforme será discutido posteriormente, aliado ao fato do Petrifilm™ Kit-HEC ter-se mostrado mais adequado que o ágar MacConkey-sorbitol para baixos níveis de contaminação (ao redor de 10^1 UFC/g).

Os gráficos **1a**, **1e**, **1i**, **6a**, **6d**, **6g**, **11a** e **11c** mostram a multiplicação de EHEC O157:H7, inoculada isoladamente, em carne moída mantida em temperatura de refrigeração (4 a 10^0 °C). Os gráficos **2a**, **2e**, **2i**, **7a**, **7d**, **7g**, **12a** e **12c** ilustram a multiplicação dessa bactéria, inoculada isoladamente, em carne moída mantida em temperatura ambiente (19 a 27^0 °C).

À temperatura de refrigeração observa-se que as contagens de EHEC inoculada isoladamente tenderam a permanecer relativamente constantes ao longo do tempo, até as 96 horas finais de experimento, para todos os níveis de inoculação empregados. Por outro lado, constata-se um aumento dessas contagens à temperatura ambiente, chegando a atingir valores da ordem de 10^8 a 10^9 UFC/g após as 48 horas finais, para níveis altos (10^6 UFC/g) e intermediários (10^3 UFC/g) de bactéria inoculados (gráficos **2a**, **2e**, **7a**, **7d**, **12a** e **12c**) e da ordem de 10^6 a 10^8 UFC/g para níveis baixos (10^1 UFC/g) de bactéria inoculados (gráficos **2i** e **7g**).

Resultados similares foram também observados por WALLS & SCOTT (1996), que inocularam 10^3 a 10^4 UFC/g de uma mistura de 6 diferentes cepas de *E.coli* O157:H7 em carne moída a pH 5,7 e 6,3 e incubaram a 35°C, 20°C e 12°C. Para um inóculo inicial de $3,2 \times 10^3$ UFC/g, os autores observaram uma contagem de $3,2 \times 10^6$ UFC/g após 96 horas de armazenamento a 12°C a pH 5,7, pH este bastante próximo ao verificado neste estudo (normalmente ao redor de 5,5 de zero a 96 horas de refrigeração e, em alguns casos, ao redor de 5,0 após 72 ou 96 horas de refrigeração). A uma temperatura de 20°C, os autores observaram um aumento da contagem inicial de $6,3 \times 10^3$ UFC/g para $6,3 \times 10^7$ UFC/g após 24 horas e para $4,0 \times 10^8$ UFC/g após 45 horas. Apesar destes valores serem bastante semelhantes aos obtidos neste trabalho, deve ser salientado que o pH da carne moída utilizado por WALLS & SCOTT (1996) era de 6,3, valor este bastante superior ao encontrado na carne neste experimento (entre 4,5 e 5,5 de zero a 48 horas de armazenamento à temperatura ambiente).

Os gráficos **1a** a **1p** ilustram o comportamento da cepa de *E.coli* O157:H7 e de *E.coli* não patogênica isoladamente ou simultaneamente inoculadas em diferentes concentrações (zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g) e mantidas em temperatura de refrigeração. Os gráficos **2a** a **2p** referem-se ao mesmo comportamento, porém em carne mantida em temperatura ambiente. De maneira geral, a observação dessas curvas de multiplicação leva a crer que as duas cepas de *E.coli* têm comportamento bastante semelhante, tanto à temperatura de refrigeração quanto à temperatura ambiente. O número de UFC/g de ambas as cepas em carne mantém-se mais ou menos constante quando armazenada em refrigeração por 96 horas. Por outro lado, em temperatura ambiente ambas as cepas se multiplicam, tendendo a contagens ao redor de 10^8 UFC/g (10^6 ou 10^7 UFC/g em alguns casos) após 48 horas, independentemente do inóculo inicial ser baixo (10^1 UFC/g), intermediário (10^3 UFC/g) ou alto (10^6 UFC/g).

ANSAY et al. (1997) observaram não haverem diferenças significativas entre o comportamento de três diferentes cepas de *E.coli* O157:H7 e entre o comportamento de cada uma delas e o de uma cepa de *E.coli* não O157:H7 utilizada como controle. As quatro cepas de *E.coli* foram armazenadas por um ano à temperatura de -20°C, tempo após o qual foi observada uma redução nas contagens de cerca 1 log₁₀ UFC/g. Os pesquisadores observaram, também, que em carne bovina moída inoculada com uma mistura de quatro diferentes cepas de *E.coli* O157:H7 e mantidas a -2°C e 2°C durante 5 semanas, havia uma redução na contagem dessas bactérias que correspondeu, em média, a 1,5 log₁₀ UFC/g para as amostras mantidas a -2°C e a 1,87 log₁₀ UFC/g para aquelas mantidas a 2°C.

Observando-se as curvas de multiplicação de EHEC O157:H7 na carne na presença da outra cepa de *E.coli* à temperatura de refrigeração (gráficos **1a** a **1p**), verifica-se a presença de algumas oscilações nas contagens de EHEC, visivelmente maiores que as oscilações nas contagens de *E.coli* não patogênica. Essas oscilações poderiam ser consequência de dificuldades técnicas com relação às metodologias empregadas para a sua enumeração. Tanto o Petrifilm™ EC como o ágar MacConkey-sorbitol contêm açúcares que são utilizados por *E.coli* não patogênica (um β-glucoronídio no caso do Petrifilm™ EC e sorbitol no caso do ágar MacConkey-sorbitol), mas não o são por *E.coli* O157:H7. Consequentemente, as colônias de *E.coli* não patogênica são mais facilmente visualizadas e identificadas do que as de *E.coli* O157:H7.

Em alguns casos, a contagem de EHEC na presença de elevadas concentrações da cepa de *E.coli* não patogênica tornou-se impraticável. Foi o que ocorreu, por exemplo, nas amostras de carne inoculadas com 10³ UFC/g de EHEC e 10⁶ UFC/g de *E.coli* não patogênica (gráfico **1f**) e com 10¹ UFC/g de EHEC e 10⁶ UFC/g de *E.coli* não patogênica (gráfico **1j**), mantidas em refrigeração. Nesses experimentos, só foi possível fazer a contagem de EHEC

após 24 horas no primeiro caso e, no segundo, não foi possível obter contagens após 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento.

No experimento à temperatura ambiente, não foi possível observar o crescimento de EHEC (inóculo 10^1 UFC/g) na presença de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica (gráfico **2j**). A maior facilidade de contagem das EHEC no experimento à temperatura ambiente em comparação ao experimento à temperatura de refrigeração deve-se ao fato de que na temperatura de refrigeração o número de bactérias se mantém muito próximo do limite de detecção das metodologias empregadas, ou seja, 10 UFC/g para o Petrifilm™ e 100 UFC/g para o ágar MacConkey-sorbitol, o que não ocorre à temperatura ambiente.

Nos gráficos **3**, **4** e **5** foram reunidas todas as curvas de multiplicação de EHEC (inóculos iniciais 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g, respectivamente), na presença de diferentes concentrações de *E.coli* não patogênica (zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g), nas amostras de carne mantidas à temperatura ambiente e à temperatura de refrigeração. Analisando-se o gráfico **3**, observa-se que, à temperatura de refrigeração, para um inóculo inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* O157:H7, as contagens dessa bactéria inoculada isoladamente ou na presença de 10^6 , de 10^3 ou de 10^1 UFC/g de *E.coli* não patogênica são bastante próximas, principalmente a partir de 48 horas. A proximidade em questão é tal que as quatro curvas praticamente se confundem. Já em carnes mantidas à temperatura ambiente utilizando-se o mesmo inóculo inicial de EHEC (10^6 UFC/g), as curvas parecem ser distintas no início, mas os valores de contagem chegam a ser bastante próximos após 48 horas. A contagem de *E.coli* O157:H7 após 24 horas à temperatura ambiente foi maior na presença de 10^1 UFC/g de *E.coli* não patogênica do que na presença de 10^6 UFC/g dessa cepa de *E.coli*. Após 48 horas, essas duas contagens são praticamente as mesmas.

Apesar de se observar, após 24 horas, contagens de EHEC maiores para inóculos iniciais menores de *E.coli* não patogênica (10^1 UFC/g), intermediárias para inóculos intermediários (10^3 UFC/g) e menores para inóculos maiores

dessa bactéria (10^6 UFC/g), não se pode afirmar que o crescimento da cepa de *E.coli* O157:H7 empregada nos testes seja menos acentuado na presença de inóculos maiores de *E.coli* não patogênica. Essa afirmação não pode ser feita principalmente pelo fato das contagens de EHEC quando inoculada isoladamente na carne (controle) terem sido intermediárias, com valores situados entre os obtidos nas amostras contendo inicialmente 10^6 nas amostras com 10^3 UFC/g de *E.coli* não patogênica. De qualquer maneira, apesar dessa diferença de contagens nos diferentes experimentos com 24 horas, as contagens ficam bastante próximas após 48 horas e, provavelmente, seriam as mesmas se os experimentos tivessem se estendido a 72 horas.

Assim como ocorre no gráfico 3, as curvas dos experimentos sob refrigeração ilustrados no gráfico 4 são bastante próximas umas das outras. Assim sendo, a essa temperatura, aparentemente, diferentes concentrações de *E.coli* não influem sobre a multiplicação de EHEC inoculada em carne moída a uma concentração de 10^3 UFC/g. Após 96 horas, as contagens foram bastante próximas, variando de $6,0 \times 10^3$ UFC/g (na ausência de *E.coli* não patogênica) a $12,0 \times 10^3$ UFC/g (na presença inicial de 10^3 UFC/g de *E.coli* não patogênica).

Já à temperatura ambiente, as curvas relativas à multiplicação de 10^3 UFC/g de *E.coli* O157:H7 na presença de zero, 10^1 e 10^3 UFC/g de *E.coli* não patogênica, praticamente se confundem, sendo que as contagens após 24 horas ($2,1 \times 10^8$ UFC/g, $2,7 \times 10^8$ UFC/g e $1,1 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente) e após 48 horas ($3,6 \times 10^8$ UFC/g, $4,6 \times 10^8$ UFC/g e $4,3 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente) chegam a ser praticamente as mesmas. Entretanto, o mesmo não ocorreu no caso das contagens de EHEC (inóculo inicial de 10^3 UFC/g) na presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica. Este experimento revelou contagens que se afastaram bastante das demais, conforme pode ser constatado no gráfico 4. Essas contagens foram de $1,0 \times 10^5$ UFC/g e de $2,0 \times 10^7$ UFC/g, após 24 e 48 horas, respectivamente. Ocorre que a temperatura da estufa nesse experimento foi menor, ou seja, entre 21°C e 22°C, enquanto que nos outros experimentos desse grupo a temperatura variou de 25°C a 26°C.

Além disso, é possível que essas menores contagens sejam conseqüentes de subestimativas devido à interferência da presença de *E.coli* não patogênica em maior concentração (10^6 UFC/g) sobre as contagens de EHEC em menor concentração (10^3 UFC/g).

Em relação aos experimentos à temperatura de refrigeração ilustrados nos gráficos 3 e 4, aqueles do gráfico 5 (experimentos com concentração inicial de *E.coli* O157:H7 de 10^1 UFC/g) revelam curvas menos próximas umas das outras, principalmente após 72 horas e 96 horas de armazenamento. Assim sendo, as amostras inoculadas com EHEC na presença de 10^1 UFC/g de *E.coli* não patogênica revelam contagens de $4,0 \times 10^1$ UFC/g após 72 horas e de $4,5 \times 10^1$ UFC/g após 96 horas. Por outro lado, as amostras inoculadas com EHEC isoladamente e na presença de 10^3 UFC/g de *E.coli* não patogênica resultaram em contagens de $5,0 \times 10^2$ UFC/g e de $10,0 \times 10^1$ UFC/g após 72 horas e de $1,0 \times 10^2$ UFC/g e de $9,5 \times 10^2$ UFC/g após 96 horas, respectivamente. Portanto, um experimento chegou a apresentar contagens maiores que o outro após 72 e 96 horas.

Possivelmente, essa variação entre as contagens de *E.coli* O157:H7 nos experimentos onde essa bactéria foi inoculada em baixa concentração seja conseqüente da interferência de microrganismos contaminantes. Ocorre que uma série de medidas foram tomadas na obtenção de amostras de carne moída para a utilização nos experimentos de inoculação, no sentido de minimizar a contaminação bacteriana. Entre essas medidas estavam a escolha do local onde a carne bovina foi adquirida (estabelecimento com boas condições de higiene), desinfecção da porção externa da carne, remoção da camada externa, esterilização prévia de superfícies, utensílios e partes do moedor e manipulação e pesagem da carne em capela de fluxo laminar. Como conseqüência, a carne moída teria uma contaminação residual microbiana mínima, com pouca ou nenhuma interferência no isolamento das bactérias propositadamente inoculadas. Para inóculos altos (10^6 UFC/g) e intermediários (10^3 UFC/g) a interferência da microbiota original da carne foi mesmo mínima. Entretanto, para

inóculos baixos (10^1 UFC/g) essa interferência foi mais significativa. Conseqüentemente, na primeira diluição das amostras foram obtidas misturas de bactérias inoculadas com bactérias inerentes da carne. Um fato interessante foi que as colônias das bactérias inoculadas (os dois tipos de *E.coli*, nesse caso) no ágar MacConkey-sorbitol e no Petrifilm™ eram maiores que as da carne. Isso ocorre pelo fato das bactérias inerentes da carne estarem estressadas pelo congelamento, ao contrário do que ocorre com as propositadamente inoculadas. Mesmo assim, a interferência dessa flora inerente da carne sobre a recuperação das bactérias inoculadas pode ser significativa, levando a erros nas contagens para inóculos baixos.

Os experimentos à temperatura ambiente ilustrados no gráfico **5** revelam que *E.coli* O157:H7 a uma concentração inicial de 10^1 UFC/g atingem a mesma contagem na ausência e na presença inicial de 10^1 UFC/g de *E.coli* não patogênica. O mesmo não ocorreu para essa concentração de EHEC na presença de 10^3 UFC/g de *E.coli* não patogênica, onde as contagens foram praticamente as mesmas após 24 e 48 horas ($8,0 \times 10^6$ UFC/g e $11,0 \times 10^6$ UFC/g). A plataforma que aparece nesse gráfico devida à mesma contagem (10^6 UFC/g) para 24 e para 48 horas é diferente do observado nos demais experimentos, sugerindo um erro experimental. Entretanto, resultados idênticos foram obtidos quando o ágar MacConkey-sorbitol foi utilizado ($1,5 \times 10^6$ UFC/g e $7,8 \times 10^6$ UFC/g após 24 e 48 horas, respectivamente). O que poderia talvez explicar essa diferença no perfil de contagens desse experimento poderia ser, mais uma vez, a interferência da presença de *E.coli* não patogênica, em maior concentração, sobre a contagem de *E.coli* O157:H7, em menor concentração. Entretanto, é interessante observar nos gráficos **2h** e **2k**, que a situação inversa ocorreu quando a concentração inicial de EHEC foi de 10^3 UFC/g e a de *E.coli* não patogênica foi de 10^1 UFC/g. Nesse caso, enquanto EHEC chegou a contagens de 10^8 UFC/g após 24 e 48 horas, *E.coli* não patogênica atingiu contagens de $5,6 \times 10^6$ UFC/g e $5,0 \times 10^6$ UFC/g após 24 e 48 horas, respectivamente, no Petrifilm™ EC. Também nesse caso, praticamente as

mesmas contagens foram obtidas em ágar MacConkey-sorbitol, ou seja, de $5,0 \times 10^6$ UFC/g após 24 horas e de $7,6 \times 10^6$ UFC/g após 48 horas. Portanto, nas duas situações, observa-se um paralelismo entre as contagens das duas diferentes cepas de *E.coli* inoculadas. Dessa maneira, a cepa inoculada em maior concentração (10^3 UFC/g) atinge níveis ao redor de 10^8 UFC/g após 24 horas de armazenamento, que se mantêm mais ou menos constantes após 48 horas. Ao mesmo tempo, a cepa de *E.coli* inoculada em menor concentração (10^1 UFC/g) atinge níveis ao redor de 10^6 UFC/g após 24 horas, mantendo-se mais ou menos constantes após 48 horas à temperatura ambiente.

Os gráficos **6a** a **6l** e **7a** a **7l** ilustram o comportamento da cepa de *E.coli* O157:H7 e de *Pseudomonas* spp. isoladamente ou simultaneamente inoculadas em diferentes concentrações (zero, 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g e 10^6 e 10^3 UFC/g, respectivamente). Devido à presença de *Pseudomonas* spp. na microbiota residual da carne, não foram realizados experimentos de inoculação de EHEC com *Pseudomonas* spp. nas concentrações zero e 10^1 UFC/g. A constatação da presença de *Pseudomonas* spp. na microbiota original da carne tem como base a observação de que a análise de amostras não inoculadas com *Pseudomonas* spp. revelou contagens da ordem de 10^2 a 10^3 UFC/g após 24 horas, de 10^3 a 10^5 UFC/g após 48 horas, de 10^5 a 10^6 UFC/g após 72 horas e de 10^6 a 10^7 UFC/g após 96 horas à temperatura de refrigeração (gráficos **6a**, **6d**, **6g** e **6l**). À temperatura ambiente, os níveis detectados eram de cerca de 10^6 UFC/g após 24 e 48 horas (gráfico **7l**). Assim sendo, as curvas de multiplicação de *Pseudomonas* spp. apresentada nos gráficos correspondem à *Pseudomonas* spp. presente naturalmente na carne.

Assim como foi observado nos testes de desafio com a cepa de *E.coli* O157:H7 e de *E.coli* não patogênica, a contagem de EHEC manteve-se relativamente constante durante as 96 horas sob refrigeração, independentemente do inóculo inicial e do crescimento de *Pseudomonas* spp. Já *Pseudomonas* spp. revelou uma contagem de 10^7 a 10^8 UFC/g após 24 horas, de cerca de 10^8 UFC/g após 48 horas e de cerca de 10^9 UFC/g após 72

e 96 horas à mesma temperatura, quando inoculado a um nível de 10^6 UFC/g (figuras **6b**, **6e**, **6h** e **6j**). Esse microrganismo, quando inoculado a uma concentração de 10^3 UFC/g, revelou contagens de cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g após 24 horas, de 10^6 a 10^7 UFC/g após 48 horas e de cerca de 10^8 UFC/g após 72 e 96 horas à temperatura de refrigeração (gráficos **6c**, **6f**, **6i** e **6k**). As contagens de *Pseudomonas* spp. após diferentes tempos de armazenamento são bastante próximas entre si, particularmente após 72 e 96 horas, independente da ausência ou da presença de diferentes concentrações de *E.coli* O157:H7.

Nos experimentos com armazenamento à temperatura ambiente, observa-se que a cepa de *E.coli* O157:H7 inoculada a uma concentração de 10^6 UFC/g atinge níveis de cerca de 10^8 UFC/g após 24 e 48 horas, independente da inoculação simultânea ou não de *Pseudomonas* spp. e da quantidade desta bactéria inoculada (gráficos **7a**, **7b** e **7c**). Para um inóculo inicial de 10^3 UFC/g de EHEC, a contagem dessa bactéria esteve ao redor de 10^6 a 10^7 UFC/g após 24 horas e de 10^7 a 10^8 UFC/g após 48 horas à temperatura ambiente (gráficos **7d**, **7e** e **7f**). Inóculos iniciais baixos dessa bactéria patogênica (10^1 UFC/g), por sua vez, atingiram contagens inferiores às obtidas com inóculos altos (10^6 UFC/g) e intermediários (10^3 UFC/g), equivalendo a valores ao redor de 10^4 a 10^5 UFC/g após 24 horas e de 10^6 a 10^7 UFC/g após 48 horas (gráficos **7g**, **7h** e **7i**).

É interessante notar que nesses testes de desafio com as cepas de *E.coli* O157:H7 e de *Pseudomonas* spp., as contagens de EHEC atingiram valores que variaram de 10^6 a 10^8 UFC/g após as 48 horas finais de experimento, dependendo do inóculo inicial dessa bactéria ser baixo, intermediário ou alto. Por outro lado, nos testes de desafio com as cepas de *E.coli* O157:H7 e de *E.coli* não patogênica, as contagens de EHEC atingiram valores maiores, da ordem de 10^8 a 10^9 UFC/g, após as 48 horas finais, para inóculos iniciais intermediários e altos dessa bactéria, conforme mencionado anteriormente. Entretanto, essa variação de comportamento da cepa de *E.coli*

O157:H7 não pode ser atribuída à presença de *E.coli* não patogênica ou de *Pseudomonas* spp., uma vez que, assim como ocorreu com a presença ou não de *E.coli* não patogênica, a presença ou não de *Pseudomonas* spp. em diferentes concentrações não refletiu sobre as contagens de *E.coli* O157:H7 após 24 e 48 horas à temperatura ambiente.

A obtenção de contagens inferiores de *E.coli* O157:H7 nos testes de desafio com *Pseudomonas* spp., em comparação aos obtidos com *E.coli* não patogênica e, também, com *Leuconostoc* spp. (relatado adiante) pode ter sido consequência do pH da carne. Nos testes de desafio com as cepas de EHEC e de *Pseudomonas* spp., o pH da carne moída utilizada (inicialmente ao redor de 5,5 em todos os lotes de carne) baixou para 4,5 após 48 horas à temperatura ambiente. O mesmo ocorreu nas amostras utilizadas como controle, ou seja, naquelas em que apenas *E.coli* O157:H7 ou apenas *Pseudomonas* spp. (nas diversas concentrações iniciais) ou nenhuma das duas bactérias era inoculada. Nos experimentos à temperatura ambiente, o pH da carne utilizada nos testes de desafio com as duas cepas de *E.coli* chegou a 5,0 e na carne utilizada nos testes de desafio com EHEC e *Leuconostoc* spp. o pH manteve-se estável em 5,5. Sendo assim, o pH foi dependente do lote de carne utilizado, podendo, possivelmente, ter contribuído para uma certa inibição da multiplicação de *E.coli* O157:H7 nos experimentos de desafio entre essa bactéria e *Pseudomonas* spp. à temperatura ambiente, quando essa multiplicação é comparada à multiplicação desse patógeno nas amostras dos outros dois lotes de carne utilizados. Apesar dessas variações de pH nas amostras de carne, deve-se salientar que todos os valores de pH obtidos nos três grupos de experimentos estavam dentro da faixa que permitiu a sobrevivência e a multiplicação de *E.coli* O157:H7 (ZHAO et al., 1993; MILLER & KASPAR, 1994; WEAGANT et al., 1994; CONNER & KOTROLA, 1995).

Com relação à multiplicação de *Pseudomonas* spp. nos experimentos à temperatura ambiente, a análise dos gráficos **7b**, **7c**, **7e**, **7f**, **7h**, **7i**, **7j**, **7k** e **7l** revela que a contagem dessa bactéria foi de cerca de 10^8 UFC/g após 24 horas

e de 10^8 a 10^9 UFC/g após 48 horas, independente da presença ou não de *E.coli* O157:H7 em diferentes concentrações. As contagens de *Pseudomonas* spp. revelaram-se ligeiramente superiores após 24 e 48 horas à temperatura ambiente, quando comparada às contagens obtidas nos mesmos tempos à temperatura de refrigeração.

Os gráficos **8**, **9** e **10** reúnem as curvas de multiplicação de EHEC (inóculos iniciais de 10^6 , 10^3 e 10^1 UFC/g, respectivamente), frente a diferentes concentrações de *Pseudomonas* spp., tanto à temperatura ambiente como à de refrigeração. O gráfico **8** revela que, para inóculos iniciais de *E.coli* O157:H7 de 10^6 UFC/g, as contagens dessa bactéria inoculada isoladamente ou na presença inicial de 10^6 ou de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. são bastante próximas, particularmente após 72 horas à temperatura de refrigeração. Os valores das contagens de EHEC dos diferentes experimentos após 24 e 48 horas sob refrigeração variam de $5,9 \times 10^6$ UFC/g para $13,9 \times 10^6$ UFC após 24 horas (sem a presença inicial de *Pseudomonas* spp. e com a presença inicial de 10^6 UFC/g dessa bactéria, respectivamente) e de $12,5 \times 10^6$ UFC/g para $32,0 \times 10^6$ UFC/g após 48 horas (na presença de um inóculo inicial de *Pseudomonas* spp. na faixa de 10^6 e de 10^3 UFC/g, respectivamente).

Com relação aos experimentos à temperatura ambiente ilustrados no gráfico **8** (inóculos iniciais de *E.coli* O157:H7 de 10^6 UFC/g), praticamente não existem diferenças entre as curvas relativas às contagens de EHEC inoculada isoladamente e na presença de um inóculo inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. Já a curva referente às contagens de *E.coli* O157:H7 na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp. distancia-se, de certa maneira, das demais, por revelar contagens ligeiramente superiores após 24 e 48 horas. Embora os resultados disponíveis sejam insuficientes para uma análise estatística, acredita-se que essas diferenças não devam ser significativas, uma vez que, nesse experimento, as contagens após 24 e 48 horas foram de $4,2 \times 10^8$ UFC/g e de $6,0 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente, enquanto que nos outros experimentos desse grupo as contagens foram de 1,2

x 10^8 UFC/g e de $1,7 \times 10^8$ UFC/g após 24 horas e de $2,2 \times 10^8$ UFC/g e de $2,6 \times 10^8$ UFC/g após 48 horas.

O gráfico 9, relativo às curvas de multiplicação de EHEC (inóculo 10^3 UFC/g) frente à *Pseudomonas* spp. revela bastante heterogeneidade nas contagens, particularmente à temperatura de refrigeração. Nessa temperatura de armazenamento, a variação entre as contagens de EHEC na presença inicial de 10^6 e de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. pode ser atribuída à diferença de cerca de dez vezes entre os inóculos iniciais de *E.coli* O157:H7. Essa diferença se mantém por 72 horas. A curva correspondente à cepa de *E.coli* O157:H7 inoculada isoladamente a uma concentração de 10^3 UFC/g revela uma variação maior, uma vez que as contagens passam de $25,0 \times 10^3$ UFC/g para $5,6 \times 10^3$ UFC/g após 24 horas, para $12,5 \times 10^3$ UFC/g após 48 horas e para $18,0 \times 10^3$ UFC/g após 72 horas. Por difícil que seja saber a causa de tal variação, o fato é que as contagens de EHEC praticamente se igualam após as 96 horas finais de armazenamento, variando de $5,4 \times 10^3$ UFC/g (na presença inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp.) a $9,0 \times 10^3$ UFC/g (na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp.).

Nos experimentos à temperatura ambiente ilustrados no gráfico 9, as curvas referentes ao teste de desafio com a cepa de *E.coli* O157:H7 (inóculo inicial de 10^3 UFC/g) e de *Pseudomonas* spp. à concentração inicial de 10^3 UFC/g e de 10^6 UFC/g, praticamente se confundem nas primeiras 24 horas de experimento. Entretanto, essas mesmas curvas seguem caminhos aparentemente distintos após 24 horas. As contagem de EHEC foram praticamente as mesmas em 24 e em 48 horas na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp., enquanto que as contagens aumentaram de $7,3 \times 10^7$ UFC/g para $3,9 \times 10^8$ UFC/g de 24 para 48 horas na presença inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. Uma pequena variação na temperatura de manutenção da carne com a presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp. poderia, possivelmente, explicar o patamar obtido nas contagens de EHEC em 24 e em 48 horas. Ocorre que, no experimento com 10^3 UFC/g de

Pseudomonas spp., a temperatura da estufa manteve-se entre 25,5°C e 26,5°C durante as 48 horas de experimento. Entretanto, no experimento com 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp., a temperatura da estufa esteve entre 19°C a 21,5°C nas primeiras 24 horas, passando a 26°C a 27°C nas 24 horas seguintes.

A curva referente à inoculação de *E.coli* O157:H7 isoladamente com armazenamento à temperatura ambiente, também visível no gráfico **9**, é bastante peculiar, diferindo bastante das demais, embora a temperatura de conservação da carne tenha sido a mesma (25°C a 26°C). O principal ponto discordante corresponde à determinação de 24 horas, na qual a contagem foi cerca de dez vezes menor que as demais. Entretanto, a contagem após 48 horas ($6,2 \times 10^7$ UFC/g) praticamente se igualou à contagem dessa bactéria na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp. após o mesmo tempo de armazenamento ($7,0 \times 10^7$ UFC/g). Assim sendo, a contagem nesses dois experimentos citados foi cerca de dez vezes inferior após 48 horas de armazenamento, em relação ao experimento onde uma concentração de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. se fez presente no início. Se esse grupo de experimentos (concentração inicial de *E.coli* O157:H7 de 10^3 UFC/g) fosse considerado de uma maneira isolada dos outros experimentos, poderia-se sugerir que a presença de *Pseudomonas* spp., particularmente na concentração inicial de 10^3 UFC/g, poderia ter contribuído, de certa forma, para um determinado aumento na multiplicação de *E.coli* O157:H7 à temperatura ambiente. Entretanto, o conjunto dos resultados dos testes de desafio com essas duas bactérias a essa temperatura não permite que tal sugestão seja feita.

O gráfico **10** reúne as curvas de multiplicação de *E.coli* O157:H7 (inóculo 10^1 UFC/g) frente à diferentes concentrações de *Pseudomonas* spp. em carne moída, tanto à temperatura ambiente como sob refrigeração. As curvas relativas aos experimentos à temperatura de refrigeração revelam que, apesar dos inóculos iniciais de EHEC terem sido praticamente os mesmos nos confrontos

com 10^6 e com 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. ($1,1 \times 10^1$ UFC/g e $1,3 \times 10^1$ UFC/g, respectivamente), as contagens tenderam a se afastar nos dois experimentos. Assim sendo, a contagem de EHEC aumentou de uma maneira mais acentuada quando na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp., quando comparada à contagem de EHEC na presença de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. O experimento onde a cepa de *E.coli* O157:H7 (inóculo 10^1 UFC/g) era inoculada isoladamente revelou uma diminuição nas contagens dessa bactéria. Assim sendo, nesse experimento, em que a bactéria foi inoculada numa concentração maior, em relação aos outros experimentos desse grupo ($25,0 \times 10^1$ UFC/g), a sua contagem tendeu a diminuir e, após 72 e 96 horas praticamente se igualou às contagens de EHEC na presença inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. (gráfico 10).

Os experimentos à temperatura ambiente ilustrados no gráfico 10 revelam curvas com um ponto inicial coincidente (mesmos inóculos de *E.coli* O157:H7) e que se distanciam com o passar do tempo, sendo que essa distância diminui, de certa maneira, de 24 para 48 horas de armazenamento. Assim como ocorreu nos experimentos à temperatura ambiente ilustrados no gráfico 9, o experimento do gráfico 10 que revelou maiores contagens de EHEC após 24 e 48 horas foi aquele no qual *Pseudomonas* spp. foi inoculada numa concentração de 10^3 UFC/g. Entretanto, ao contrário do que ocorreu nos experimentos apresentados no gráfico 9, onde as menores contagens foram obtidas quando *E.coli* O157:H7 era inoculada isoladamente, no gráfico 10 as menores contagens de EHEC foram observadas no experimento em que essa bactéria era inoculada simultaneamente com 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp. Apesar das contagens mais altas de *E.coli* O157:H7 observadas na presença inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp. nos dois grupos de experimentos à temperatura ambiente, não se pode afirmar que esse inóculo de *Pseudomonas* spp. favorece a multiplicação dessa bactéria a essa temperatura. Ocorre que no grupo de experimentos ilustrados no gráfico 8 as maiores contagens de EHEC foram observadas na presença inicial de 10^6 UFC/g e as contagens dos outros

dois experimentos desse grupo (na ausência e na presença inicial de 10^3 UFC/g de *Pseudomonas* spp.) eram praticamente as mesmas.

Os resultados apresentados indicam que a presença de diferentes concentrações de *Pseudomonas* spp. não influenciou significativamente na multiplicação de *E.coli* O157:H7 em carne moída inoculada mantida em refrigeração e em temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos obtidos com *E.coli* não patogênica.

Outros pesquisadores também estudaram o comportamento de EHEC frente a outros microrganismos em diversos tipos de alimentos mantidos sob variadas condições de armazenamento.

KIROV et al. (1990) avaliaram a interferência de *Pseudomonas fragi* sobre o crescimento de uma cepa de *Aeromonas* spp., observando que não houve inibição do crescimento destas *Aeromonas* spp. pelo crescimento rápido de *Pseudomonas fragi* à temperatura de refrigeração. Os autores sugeriram que o rápido crescimento de *Pseudomonas* spp. em carnes e em peixes armazenados em aerobiose em temperatura de refrigeração, iria possivelmente resultar em uma predominância dessa bactéria antes que níveis de *Aeromonas* spp. aumentassem significativamente.

A sugestão de KIROV et al. (1990) não pode ser aplicada à *E.coli* O157:H7 na presença de *Pseudomonas* spp. No presente estudo, *Pseudomonas* spp. apresentou contagem crescente ao longo do tempo em carne mantida em temperatura de refrigeração, enquanto que EHEC manteve suas contagens em um nível relativamente constante. Ocorre que níveis tão baixos como 1 a 4 microrganismos por grama de *E.coli* O157:H7 têm sido descritos como sendo suficientes para provocar infecções (DUNKAN & HACKNEY, 1994). Ao mesmo tempo, quantidades ínfimas como 0,3 a 15 células por grama e 0,3 a 0,4 células por grama dessa bactéria foram isoladas de hambúrguer e de salame, respectivamente, envolvidos em surtos (DOYLE et al., 1997). Assim sendo, mesmo níveis baixos de *E.coli* O157:H7 que se mantêm ao longo da armazenagem da carne podem representar risco à saúde.

FREEDMAN et al. (1989) observaram o efeito inibitório de extrato de meio de cultivo líquido de *Pseudomonas aeruginosa* sobre *Pseudomonas fluorescens*, em leite. A cepa de *Ps. aeruginosa* havia revelado ação inibitória sobre *Ps. fluorescens* em ágar e em caldo. Os autores verificaram que um inóculo inicial de 10^5 UFC/g de *Ps. fluorescens*, em leite, atingia contagens de 10^8 UFC/g e de 10^9 UFC/g, após 24 e 48 horas, respectivamente, nas amostras controle, ou seja, sem a presença de extrato de *Ps. aeruginosa*. As amostras de leite contendo extrato dessa bactéria, por outro lado, revelaram contagens equivalentes a cerca de 10^7 UFC/g após 24 horas e após 48 horas. O mesmo extrato de *Ps. aeruginosa* revelou uma inibição imediata e quase completa de *Staphylococcus aureus* no leite, resultando numa redução, em relação aos controles, de mais de 10^4 UFC/g após 24 horas e após 48 horas.

BRIDGEMAN & ZOTTOLA (1996) observaram atividade inibitória contra *E.coli* O157:H7 por *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia liquefaciens* isoladas de carne moída. Observaram, também, que a substância inibitória era uma proteína, levando a crer que se tratava de uma bacteriocina.

BAGI & BUCHANAN (1996) observaram um abaixamento da densidade máxima atingida em meio de cultura por uma cepa de *Listeria monocytogenes* na presença de uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*. Os autores verificaram que temperaturas de armazenamento baixas, baixas concentrações de cloreto de sódio e pH neutro favoreciam essa supressão.

Os gráficos 11a a 11f e 12a a 12f ilustram o comportamento de *E.coli* O157:H7 e de *Leuconostoc* spp. (bactéria lática) isoladamente ou simultaneamente inoculados em diferentes concentrações (zero, 10^6 e 10^3 UFC/g e 10^6 UFC/g, respectivamente) em carne moída, mantida sob refrigeração e em temperatura ambiente. Assim como ocorreu no estudo com *Pseudomonas* spp., não foram realizados experimentos de inoculação de EHEC com *Leuconostoc* spp. nas concentrações zero, 10^1 e 10^3 UFC/g, devido à presença de bactérias láticas na microbiota residual da carne. A constatação da presença de bactérias láticas na microbiota foi feita através da análise da carne,

que revelou contagens desses microrganismos ao redor de 10^4 UFC/g. Assim sendo, nos experimentos onde não houve inoculação de *Leuconostoc* spp., as curvas de multiplicação de bactérias lácticas apresentadas nos gráficos correspondem às bactérias lácticas presentes naturalmente na carne.

Os gráficos **11a** a **11f** revelam que o comportamento de *E.coli* O157:H7 frente às bactérias lácticas (*Leuconostoc* spp. + bactérias lácticas da microbiota residual) em carne moída à temperatura de refrigeração foi semelhante ao observado nos dois outros grupos de testes de desafio descritos, ou seja, *E.coli* não patogênica e *Pseudomonas* spp. A contagem de EHEC manteve-se relativamente constante nas amostras de carne moída inoculadas, durante as 96 horas à temperatura de refrigeração, independente da inoculação simultânea ou não, de *Leuconostoc* spp.

As bactérias lácticas autóctones, tiveram sua contagem inicial de cerca de 10^4 UFC/g aumentada para cerca de 10^5 UFC/g após 24 horas, para 10^6 a 10^7 UFC/g após 48 horas, para cerca de 10^7 UFC/g após 72 horas e para cerca de 10^8 UFC/g após 96 horas à temperatura de refrigeração (gráficos **11a**, **11c** e **11f**). As contagens de bactérias lácticas nas amostras inoculadas com 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. foram ligeiramente superiores àquelas obtidas para as amostras não inoculadas com essa bactéria após 24 e 48 horas (10^6 UFC/g e 10^7 UFC/g, respectivamente), igualando-se às outras após 72 horas (10^7 UFC/g), conforme pode ser observado nos gráficos **11b**, **11d** e **11e**. Nenhuma diferença perceptível na multiplicação das bactérias lácticas pôde ser observada nas amostras em que *E.coli* O157:H7 estava presente, nas duas concentrações diferentes (10^3 e 10^6 UFC/g).

Os experimentos à temperatura ambiente, por sua vez, revelaram um comportamento da cepa de *E.coli* O157:H7 bastante similar ao observado nos outros dois grupos de experimentos à mesma temperatura descritos (gráficos **12a** a **12f**). Assim sendo, inóculos iniciais de 10^6 UFC/g dessa bactéria revelaram contagens de cerca de 10^8 UFC/g após 24 horas e na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g após 48 horas. Ao mesmo tempo, inóculos iniciais de 10^3 UFC/g

resultaram em contagens de 10^7 a 10^8 UFC/g e de cerca de 10^8 UFC/g após 24 e 48 horas, respectivamente.

O gráfico **13** reúne os resultados de todos os testes de desafio com *E.coli* O157:H7 e *Leuconostoc* spp. realizados. Analisando-se as curvas relativas aos experimentos à temperatura de refrigeração, observa-se um paralelismo entre os resultados relativos ao inóculo inicial de EHEC de 10^6 UFC/g. Assim sendo, essa bactéria inoculada isoladamente revelou contagens superiores em relação às obtidas com a inoculação simultânea de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp., como reflexo do inóculo inicial maior. Após 24 horas, as contagens de EHEC se aproximaram, mantendo-se paralelas até o final do experimento.

Nos experimentos à temperatura de refrigeração em que o inóculo inicial de *E.coli* O157:H7 foi de 10^3 UFC/g, apesar da diferença entre os inóculos iniciais dessa bactéria ter sido exatamente a mesma que a do experimento descrito acima, não ocorreu um paralelismo entre as contagens. A figura **13** mostra que as contagens de EHEC inoculada a uma concentração inicial de 10^3 UFC/g, na ausência e na presença de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp., foram bastante próximas após 24 horas ($5,5 \times 10^3$ UFC/g e $6,2 \times 10^3$ UFC/g, na ausência e na presença de *Leuconostoc* spp. inoculado, respectivamente). As contagens diferiram, de certa maneira, nas leituras de 48 e 72 horas, passando a ser praticamente idênticas na leitura de 96 horas ($4,0 \times 10^3$ UFC/g e $3,5 \times 10^3$ UFC/g na ausência e na presença de *Leuconostoc* spp. inoculado, respectivamente).

À temperatura ambiente, os perfis das curvas referentes aos diferentes testes de desafio entre *E.coli* O157:H7 e *Leuconostoc* spp. são ainda mais semelhantes, conforme ilustra o gráfico **13**. Assim, as contagens de EHEC inoculada a uma concentração de 10^3 UFC/g na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. e sem a inoculação dessa bactéria foram bastante próximas após 24 horas, sendo que essas contagens praticamente se igualaram após 48 horas ($3,4 \times 10^8$ UFC/g e $4,0 \times 10^8$ UFC/g, na ausência e na

presença de *Leuconostoc* spp. inoculado, respectivamente). Nos experimentos em que o inóculo inicial de *E.coli* O157:H7 era de 10^6 UFC/g, as contagens dessa bactéria, na ausência e na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. inoculado, foram bastante próximas após 24 horas ($2,6 \times 10^8$ UFC/g e $2,0 \times 10^8$ UFC/g na ausência e na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. inoculado, respectivamente), como também após 48 horas ($1,3 \times 10^9$ UFC/g na ausência e $6,6 \times 10^8$ UFC/g na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. inoculado).

Assim sendo, aparentemente, a presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp., bem como a multiplicação de *Leuconostoc* spp. inoculado e das bactérias lácticas autóctones não exerceram influências sobre a multiplicação de *E.coli* O157:H7 em carne moída mantida por 96 horas à temperatura de refrigeração e por 48 horas à temperatura ambiente.

Com o intuito de pesquisar processos de controle da presença de *E.coli* O157:H7 na produção de embutidos, KASPAR & LUCHANSKY (1996) observaram que o processo de fermentação em si era insuficiente para eliminar altos níveis desse patógeno, independentemente da temperatura (70°F , 90°F ou 110°F) ou do pH ($<4,6$ ou $>5,0$) de fermentação utilizados. Os autores concluíram que, para ocorrer uma redução de 5 log de *E.coli* O157:H7 durante a produção de embutidos fermentados, conforme exigências das autoridades dos Estados Unidos, é necessário que a fermentação seja feita a temperaturas mais altas (90°F ou 110°F) a um pH mais baixo ($<4,6$), seguida de cura ou aquecimento e, posteriormente, secagem.

Ao mesmo tempo, HINKENS et al. (1996) constataram que o processo tradicional, não térmico, de obtenção de lingüiça tipo “peperoni”, na presença de uma cultura “starter” comercial de *Pedococcus acidilactici* era suficiente apenas para eliminar cerca de 2 log de UFC/g de *E.coli* O157:H7. A redução de cerca de 5 a 6 log de UFC/g desse patógeno era conseguida apenas quando as temperatura internas das lingüiças eram mantidas a 53°C por 60 minutos ou quando o produto cárneo era aquecido a 63°C instantaneamente.

O efeito de bactérias lácticas no controle de *E.coli* O157:H7 foi estudado em outros tipos de alimentos, principalmente leite e derivados. SOUDAH & BOOR (1996) observaram uma redução nas contagens de *E.coli* O157:H7 em leite UHT, na presença de bactérias lácticas utilizadas como “starters”, tanto em fermentações termofílicas (37°C ou 42°C por 24 horas) como em fermentações mesofílicas (21°C ou 30°C por 24 horas). Foi observado, também, que misturas de bactérias lácticas eram mais eficazes nessa redução das contagens do que o eram as culturas isoladas. Os autores sugeriram que esse fato poderia ser resultante da produção de ácido devido ao efeito sinérgico das bactérias atuando em conjunto e que, conseqüentemente, a utilização de culturas “starters” combinadas poderia aumentar a segurança de laticínios fermentados.

BOOR (1996) inoculou níveis baixos (10 UFC/g), médios (10^3 UFC/g) e altos (10^5 UFC/g) de *E.coli* O157:H7 em leite UHT simultaneamente com 1% de bactérias lácticas termófilas (*Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*) ou mesófilas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ou *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*). Após a fermentação das amostras de leite inoculado por 48 horas a 37°C ou 42°C (amostras com bactérias lácticas termófilas) e a 21°C ou 30°C (amostras com bactérias lácticas mesófilas), *E.coli* O157:H7 não era detectada nas amostras com *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* ou *L. lactis* ssp. *lactis*. Nas amostras com *S. thermophilus* e *L. lactis* ssp. *cremoris*, *E.coli* O157:H7 ainda era detectada após 40 dias, período em que as bactérias lácticas inoculadas não eram mais detectadas.

Ao mesmo tempo, BOOR (1996) inoculou *E.coli* O157:H7 nos três níveis de concentração na preparação de iogurte a partir de leite integral adicionado de 1,25% de *S. thermophilus* e *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus*. Após armazenamento a 47°C até o desenvolvimento de coalhada consistente, com posterior armazenamento a 4°C, *E.coli* O157:H7 não era detectada. Para finalizar, o pesquisador inoculou *E.coli* O157:H7 nas três concentrações em produtos fermentados lácteos. Verificou que o patógeno sobrevivia nesses

produtos alimentícios durante os 60 dias de armazenamento em refrigeração, em qualquer nível de inoculação. Baseado nesses resultados, concluiu-se que *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* e *L. lactis* ssp. *cremoris* têm a capacidade de inibir *E.coli* O157:H7 e que, conseqüentemente, a presença desse patógeno em iogurte comercial, motivo inclusive para a ocorrência de surtos, possivelmente resulta de contaminação pós-processamento.

MASSA et al. (1997), também com o intuito de avaliar o comportamento de *E.coli* O157:H7 em iogurte, inocularam 10^3 UFC/mL e 10^7 UFC/mL desse patógeno em leite de vaca, seguido de fermentação a 42°C por até 5 horas, com posterior armazenamento do iogurte a 4°C. Dois tipos diferentes de iogurte foram obtidos, um com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* como “starters” e o outro com essas bactérias acrescidas de *Bifidobacterium bifidum* (iogurte “bífido”). *E.coli* O157:H7 sobrevivia em ambos os tipos de iogurte, tanto na fermentação quanto no seu armazenamento. Assim sendo, nos dois tipos de iogurte, o inóculo inicial de $3,2 \times 10^3$ UFC/mL de *E.coli* O157:H7 revelou mudanças significativas nas contagens após 24 horas, sendo as mesmas diminuíram lentamente até atingir um mínimo de cerca de $5,3 \times 10^2$ UFC/mL após 7 dias a 4°C. Para inóculos iniciais maiores (10^7 UFC/mL), uma redução de 1 log foi observada após 4 dias, sendo que uma contagem de cerca de 10^5 UFC/mL de EHEC foi obtida após os 7 dias a 4°C, para ambos os tipos de iogurte. Após 4 dias (96 horas) os autores observaram uma diminuição nas contagens de *E.coli* O157:H7, sendo que essa diminuição foi maior para inóculos altos dessa bactéria. No presente trabalho, praticamente não foi observada variação nas contagens de *E.coli* O157:H7 na presença de *Leuconostoc* spp. após 96 horas de armazenamento de carne moída inoculada, em temperatura de refrigeração. Além da diferença entre os alimentos utilizados nos dois experimentos, o efeito sinérgico das 2 a 3 bactérias atuando em conjunto no experimento descrito, conforme sugerido por SOUDAH & BOOR (1996), poderia explicar as pequenas diferenças entre as variações das contagens de EHEC obtidas nos dois experimentos.

Os gráficos **14a** e **14b** representam a multiplicação de EHEC O157:H7 em carne moída a uma concentração inicial de 10^6 UFC/g, na ausência e na presença de um inóculo inicial também de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica, de *Pseudomonas* spp. ou de *Leuconostoc* spp., em temperatura de refrigeração (**14a**) e em temperatura ambiente (**14b**). Em ambos os gráficos, a curva que ilustra a multiplicação de *E.coli* O157:H7 inoculada isoladamente (curva de cor vermelha) é resultante da média das contagens desse patógeno obtidas a partir dos três diferentes lotes de carne moída utilizados nos três grupos de experimentos (os desafios de EHEC com *E.coli* não patogênica, com *Pseudomonas* spp. e com *Leuconostoc* spp.).

Analisando-se o gráfico **14a**, verifica-se que a curva referente às contagens de EHEC no teste de desafio com *Leuconostoc* spp., encontra-se bastante deslocada para baixo, em relação às outras três curvas. O deslocamento dessa curva é conseqüente de valores de contagem de EHEC inferiores, resultantes de um inóculo inicial menor. As outras três curvas ilustradas no gráfico **14a**, por outro lado, são bastante próximas. As contagens de EHEC inoculada isoladamente (média) praticamente coincidiram com essas contagens na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp., conforme pode ser constatado no gráfico **14a**.

O gráfico **14a** também mostra que as contagens de EHEC inoculadas isoladamente e na presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica e de *Pseudomonas* spp. mantiveram-se praticamente constantes ao longo do tempo. Essas contagens foram, em média, de $13,9 \times 10^6$ UFC/g no início e de $15,5 \times 10^6$ UFC/g no final do experimento (96 horas em refrigeração). A curva referente às contagens de *E.coli* O157:H7 no teste de desafio com *Leuconostoc* spp., tem um perfil diferente das outras curvas do gráfico **14a**., pois revela uma contagem relativamente estável nas primeiras 48 horas e um aumento dessas contagens nas 48 horas finais. Entretanto, esse aumento de contagens de EHEC de $1,2 \times 10^6$ UFC/g (início) para $4,0 \times 10^6$ UFC/g (final) não parece ser significativo.

O gráfico **14b** indica que as contagens de *E.coli* O157:H7 nos diferentes experimentos à temperatura ambiente são bastante próximas. Essa proximidade das contagens ocorre, particularmente, nas 48 horas finais, nas quais foi observada variação de $3,3 \times 10^8$ UFC/g para $6,6 \times 10^8$ UFC/g, na presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica e de *Leuconostoc* spp., respectivamente. O gráfico **14b** mostra com clareza que a presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. ou *Leuconostoc* spp. não interferiu no aumento das contagens iniciais de 10^6 UFC/g de *E.coli* O157:H7, em carne moída mantida em temperatura ambiente por 48 horas.

O gráfico **14a** mostra que a presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica ou de *Pseudomonas* spp. não interferiu sobre a multiplicação de *E.coli* O157:H7 em carne moída mantida em refrigeração por 96 horas. No caso das bactérias lácticas, se houve uma interferência da presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. sobre a multiplicação de *E.coli* O157:H7 em carne moída mantida em refrigeração por 96 horas, ocasionando um ligeiro aumento nas contagens de EHEC nas 48 horas finais, essa diferença aparentemente não foi significativa.

Os gráficos **15a** e **15b** mostram a multiplicação de *E.coli* O157:H7 em carne moída inoculada a uma concentração de 10^3 UFC/g, na ausência e na presença de inóculos iniciais de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. ou *Leuconostoc* spp. em temperatura de refrigeração (**15a**) e em temperatura ambiente (**15b**). Assim como ocorreu nos gráficos **14a** e **14b**, os valores das contagens de EHEC inoculada isoladamente são uma média das contagens obtidas nos três diferentes lotes de carne, utilizados nos três diferentes grupos de experimentos de desafio. As curvas que representam essas contagens também são de cor vermelha. O gráfico **15a** mostra um certo paralelismo entre as curvas que representam as contagens de *E.coli* O157:H7 na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp. e de *Pseudomonas* spp. A diferença entre as curvas ocorre devido à diferença entre os inóculos iniciais de EHEC nos dois experimentos ($1,2 \times 10^3$ UFC/g e $8,9 \times 10^3$ UFC/g na

presença de *Leuconostoc* spp. e de *Pseudomonas* spp., respectivamente). Apesar de uma aparente diminuição nas contagens de EHEC inoculada isoladamente, nas primeiras 24 horas, a curva referente a essas contagens de EHEC revela-se bastante próxima à curva relativa às contagens dessa bactéria na presença de *Leuconostoc* spp. a partir de 24 horas. Já a curva referente às contagens de *E.coli* O157:H7 na presença de *E.coli* não patogênica só é visível nas primeiras 24 horas, pois a partir de 48 horas, a grande quantidade de *E.coli* não patogênica presente impediu as contagens de *E.coli* O157:H7 nas placas Petrifilm™ EC. As contagens de EHEC inoculada isoladamente após 96 horas à temperatura de refrigeração (valor médio de $5,8 \times 10^3$ UFC/g), foram bem próximas às contagens dessa bactéria na presença inicial de 10^6 UFC/g de *Pseudomonas* spp. ($9,0 \times 10^3$ UFC/g) e de *Leuconostoc* spp. ($3,5 \times 10^3$ UFC/g).

O gráfico **15b** mostra três curvas bastante próximas e uma quarta bastante distanciada das outras. A curva afastada das outras é a que ilustra as contagens de *E.coli* O157:H7 a uma concentração inicial de 10^3 UFC/g na presença inicial de 10^6 UFC/g de *E.coli* não patogênica. Novamente, o motivo mais provável para o diferença no perfil da curva em questão é a dificuldade de efetuar, de forma adequada, a contagem de *E.coli* O157:H7 nas placas de Petrifilm™ EC, quando ocorre a presença de grandes quantidades de *E.coli* não patogênica. No gráfico **15b**, verifica-se que as contagens de *E.coli* O157:H7 inoculada isoladamente são semelhantes às contagens dessa bactéria na presença de *Pseudomonas* spp. e de *Leuconostoc* spp., tanto após 24 horas quanto após 48 horas.

Com base no exposto até o presente, pode-se dizer que, de maneira geral, a presença de *E.coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. ou *Leuconostoc* spp. em diferentes concentrações iniciais, aparentemente não influenciou sobre a multiplicação de inóculos iniciais de 10^6 UFC/g (altos), de 10^3 UFC/g (intermediários) e de 10^1 UFC/g (baixos) de *E.coli* O157:H7, tanto à temperatura ambiente quanto à temperatura de refrigeração e, caso tenha havido alguma influência sobre a multiplicação desse patógeno a essas temperaturas, essa

influência foi muito pequena. Essa conclusão é semelhante àquela que chegaram outros pesquisadores.

Assim, SANTOS et al. (1995) observaram que as contagens de EHEC inoculada em carne moída mantinham-se relativamente constantes ao longo de 12 dias à temperatura de 9,5°C, com uma variação inferior a 1 log, enquanto bactérias contaminantes Gram negativas tiveram suas contagens aumentadas do quarto ao décimo segundo dia de armazenamento à mesma temperatura. Esses autores concluíram que, aparentemente, a presença de outros microrganismos na carne moída não influiu nos níveis de EHEC. Por outro lado, WHITING et al. (1996) observaram que o tempo de sobrevivência de *E.coli* O157:H7 era inferior quando a temperatura era superior a 11°C e o pH era inferior a 5,0. Os pesquisadores testaram a sobrevivência de *E.coli* O157:H7 em caldo BHI em diversas condições de temperatura (4° a 37°C), de pH (3,5 a 7) e de concentrações de sais, de lactato e de nitrito

GREER & DILTS (1995) observaram que bactérias deteriorantes, como *Pseudomonas fragi* e *Brochothrix thermosphacta* cresciam tanto na parte gordurosa quanto na parte magra da carne suína, enquanto que patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila* cresciam apenas no tecido gorduroso. Segundo esses autores, *A. hydrophila* revelou-se incapaz de sobreviver na parte magra da carne. Assim existe a possibilidade das bactérias inoculadas em carne moída no presente trabalho não terem interferido na multiplicação umas das outras, por não terem interagido na carne, em virtude de afinidades por porções distintas desse alimento. Assim enquanto *E.coli* O157:H7 poderia ter se ligado e multiplicado predominantemente em porções lipídicas da carne moída, as outras bactéria utilizadas nos diferentes testes de desafio poderiam ter-se ligado e multiplicado nas porções não lipídicas.

No presente trabalho, foi detectada inibição “in vitro” de *E.coli* O157:H7 por parte das cepas de *Pseudomonas* spp. e de *Leuconostoc* spp. utilizadas nos testes de desafio, constatada através da formação de halos de inibição em

água, conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Entretanto, essa inibição não pôde ser observada em carne moída. Isto indica que a observação da presença de halos de inibição do crescimento de uma bactéria na presença de outra em meio de cultura não necessariamente significa que a inibição também ocorrerá nos alimentos. Muitas são as razões para esse fenômeno. MONTVILLE & WINKOWSKI (1997) citam alguns fatores que diminuem a inibição por nisina, como baixas temperaturas, presença de fosfolípidos e de gordura. Os autores salientam que, na maioria das aplicações práticas, a nisina é utilizada como parte de uma barreira múltipla de um sistema inibitório. Assim sendo, é possível que no presente trabalho, o efeito de inibição de *E.coli* O157:H7 por *Leuconostoc* spp. e por *Pseudomonas* spp. não tenha ocorrido em carne, por se tratar de uma inibição onde havia a necessidade de um outro fator que atuasse em conjunto. Por outro lado, essa inibição ocorreu em meio de cultura, possivelmente por se tratar de um ambiente mais limitado e propício à síntese de compostos com atividade antimicrobiana.

A esse respeito, KATLA et al. (1997) testaram a influência de fatores intrínsecos, como a concentração de água, a concentração de cloreto de sódio, o pH e a densidade da cepa indicadora, concluindo que esses fatores alteram o perfil de inibição das bacteriocinas. Em determinadas condições, como, por exemplo, aumento da permeabilidade da célula por tratamento com EDTA ou por mutação na LPS, ou injúria subletal, bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas exercem efeito sobre microrganismos Gram negativos (STEVENS et al., 1992; KALCHAYANAND et al., 1992; CUTTER & SIRAGUSA, 1995). Embora neste experimento tenha sido verificado que o halo de inibição da cepa de *Leuconostoc* spp. contra a cepa de *E.coli* O157:H7 não era devido à produção de bacteriocina, a diferença entre os resultados no água e na carne poderia ser atribuída a essas variações de comportamento citadas por KATLA et al. (1997).

As bactérias lácticas são capazes de inibir outras bactérias por outros mecanismos que não a produção de bacteriocinas, como a produção de

compostos bacteriostáticos como o ácido láctico e a própria competição contra outros microrganismos (GUERRERO et al., 1995). Outros compostos, como ácidos, bacteriófagos, peróxido de hidrogênio e outros inibidores não específicos também podem ser produzidos (FREEDMAN et al., 1989; MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997). No presente experimento, apesar de não se saber a natureza do composto produzido pela cepa de *Leuconostoc* spp. que resultou na inibição de *E.coli* O157:H7 em placa, observou-se que o referido composto não foi eficaz na inibição desse patógeno em carne bovina moída.

A natureza do composto produzido pela cepa de *Pseudomonas* spp. e que resultou na inibição de *E.coli* O157:H7 em ágar não foi investigada neste trabalho. Entretanto, a produção de sideróforos por cepas de *Pseudomonas* spp. tem sido descrita (GRAM, 1993; CHAMPOMIER-VERGÈS & RICHARD, 1994; CHENG et al., 1995). Desta maneira, a possibilidade desse composto inibidor ter sido produzido pela cepa de *Pseudomonas* spp. explicaria a não inibição de *E.coli* O157:H7 na carne bovina. Assim sendo, essa diferença entre resultados no meio de cultura e no alimento poderia ser atribuída à abundância de ferro, particularmente na forma hemínica, na carne bovina. Conseqüentemente, por mais que a cepa de *Pseudomonas* spp. produzisse sideróforos, a carne dificilmente iria ficar depletada de ferro, sendo que sempre haveria uma quantidade suficiente desse mineral para ser utilizada pela cepa de *E.coli* O157:H7.

CHENG et al. (1995) verificaram que três cepas de *Pseudomonas fluorescens* apresentavam amplo espectro de atividade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton, tanto contra patógenos de origem alimentar Gram positivos (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) quanto Gram negativos (*Salmonella enteritidis*, *E.coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*). Entretanto, quando o efeito antimicrobiano das três cepas de *Ps.fluorescens* contra *S. enteritidis* era testado em ágar dextrose-batata, um meio de cultura rico em ferro, essa inibição não era observada. Ao mesmo tempo, a adição de cloreto férrico ao ágar Mueller-Hinton diminuía o efeito

inibitório das três cepas de *Ps. fluorescens* contra *S. enteritidis*. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a atividade inibitória das três cepas era relacionada ao ferro. Segundo eles, essa conclusão foi reforçada pela não inibição de bactérias lácticas pelas cepas de *Ps. fluorescens*, provavelmente porque essas bactérias têm a capacidade de crescer em ambientes deficientes em ferro.

Trabalhando com cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de peixes frescos e deteriorados, GRAM (1993) verificou que 67 cepas dessa bactéria, de um total de 209 testadas, inibiam o crescimento de um ou mais microrganismos. *E.coli*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram as bactérias utilizadas para a verificação desse efeito inibitório, sendo que *S. aureus* e *A. sobria* revelaram-se mais susceptíveis. O autor (1993) observou que a adição de ferro ao substrato eliminava o efeito inibitório de 2/3 das cepas de *Pseudomonas* spp. e que 80% das cepas inibitórias produziam sideróforos, enquanto que 86% das cepas não inibitórias não eram produtoras. O autor observou, também, que a atividade inibitória de 21 cepas de *Pseudomonas* spp. não era totalmente eliminada com a suplementação de ferro, atribuindo essa atividade à produção de outras substâncias inibitórias, como antibióticos, bacteriocinas e HCN. GRAM (1993) não obteve efeito inibitório em meio líquido e sugeriu que a não inibição em caldo poderia ser devida à alimentação cruzada entre as cepas ou devida à necessidade de *Pseudomonas* spp. estar presente em grande concentração para resultar em inibição ou, ainda, devido à não produção de antibióticos em meio líquido.

Com o objetivo de verificar a existência de mecanismos de inibição natural que controlem a deterioração da carne CHAMPOMIER-VERGÈS & RICHARD (1994) testaram cerca de 750 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de carne, peixe, leite e vegetais, a fim de verificar o efeito inibitório contra dez cepas de *Pseudomonas fragi* isoladas de carne. Os pesquisadores verificaram que nenhuma das cepas isoladas de carne ou de carne de aves revelaram

efeito inibitório e que 25% das cepas de peixe foram capazes de inibir as cepas de *Ps. fragi*. Os autores verificaram, também, que apenas uma das cepas inibitórias o continuava sendo com a adição de meio de cultura suplementado com ferro e que a natureza do composto inibitório produzido por essa cepa era protéica, provavelmente se tratando de substância semelhante a uma bacteriocina.

CHAMPOMIER-VERGÈS & RICHARD (1994) selecionaram as duas cepas de *Pseudomonas* spp. que se mostraram mais inibitórias em meio depletado de ferro para testes posteriores. Segundo os autores, as duas cepas selecionadas inibiam, embora fracamente, as cepas indicadoras em ágar extrato de carne e, assim, poderiam ter a capacidade de apresentar um potencial inibitório em carne. Os pesquisadores verificaram, ainda, que as duas cepas testadas não revelaram capacidade inibitória na presença de ferro, que o tratamento com protease não resultava em perda dessa capacidade e que as mesmas eram capazes de crescer na presença de altos níveis de ácido acético etileno diamino hidroxifenílico (EDDHA), o que é conseguido apenas por cepas produtoras de sideróforos com alta afinidade por ferro. Baseados nessas observações, os autores (1994) concluíram que as duas cepas testadas (*Ps.putida* e de *Ps.fluorescens*), possivelmente eram produtoras de sideróforo extracelular, capaz de complexar o ferro e, conseqüentemente, tornando esse mineral não biodisponível e prejudicando bactérias sensíveis.

Anteriormente, FREEDMAN et al. (1989) haviam verificado que a maioria de um total de 13 cepas de *Pseudomonas* spp. testadas revelaram-se com alguma capacidade de inibir outras bactérias. Duas cepas de *Ps.aeruginosa* revelaram-se com maior potencial de inibição e essa inibição variava conforme o tipo de meio de cultura utilizado. Embora as duas cepas mostraram-se produtoras de substâncias inibidoras também quando os testes eram feitos a partir do extrato do crescimento das mesmas em meio líquido, o meio sólido revelou-se mais eficaz na demonstração de efeito antagônico das cepas de *Pseudomonas* spp. testadas. Os pesquisadores observaram um espectro de

inibição mais amplo (contra um maior número de bactérias) quando um meio deficiente em ferro era empregado, o que os levou a sugerir o possível envolvimento de sideróforos nessa inibição.

FREEDMAN et al. (1989) observaram, também, que a inibição de algumas bactérias Gram negativas, entre eles as cepas testadas de *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* e *Yersinia enterocolitica*, e das Gram positivas *Bacillus cereus* e *Listeria* spp. era menos dependente do meio de cultivo empregado. Apesar do baixo espectro de inibição observado a partir meio de cultura líquido, os pesquisadores obtiveram efeito inibitório de duas cepas de *Ps. putida* contra *Ps. fluorescens*. Com base no espectro de inibição limitado dessas cepas, os autores levantaram a possibilidade dessa inibição ocorrer devido à existência de substâncias semelhantes a bacteriocinas.

Os gráficos **16** a **20** representam os logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 obtidas empregando-se o Petrifilm™ Kit-HEC frente aos logaritmos das contagens obtidas através do ágar MacConkey-sorbitol, comparados por meio de linhas de tendência. Os resultados das contagens desse patógeno através das duas metodologias foram considerados para cada grupo de testes de desafio (gráficos **16** a **18**) e para todos os experimentos em conjunto (gráficos **19** e **20**). O valor R^2 presente nos gráficos representa o coeficiente de determinação, também chamado de coeficiente de explicação, e sua raiz quadrada representa o índice de correlação. A equação do tipo “ $y = ax + b$ ” é a equação da reta presente em cada gráfico.

Os gráficos **16a** e **16b** plotam os valores dos logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 obtidas nos testes de desafio com essa bactéria e *E.coli* não patogênica em carne mantida em temperatura de refrigeração (**16a**) e em temperatura ambiente (**16b**). Ambos os gráficos revelam valores de R^2 altos, acima de 0,90, e valores de “a” e “b” na equação da reta bastante próximos de um e de zero, respectivamente. Assim sendo, as duas metodologias de contagem utilizadas apresentam alto índice de correlação e valores de

contagem da mesma ordem de grandeza, na presença de *E.coli* não patogênica, em diversas concentrações das duas cepas de *E.coli*.

Entretanto, comparando-se os gráficos **16a** e **16b**, observa-se que as duas metodologias apresentaram índice de correlação mais altos e resultados de contagens mais próximos na presença de *E.coli* não patogênica em carne mantida em temperatura ambiente, quando comparados aos resultados em temperatura de refrigeração. Essa observação tem como base não apenas os valores de R^2 (0,98 nos experimentos à temperatura ambiente contra 0,90 naqueles à temperatura de refrigeração) e as equações das retas de tendência (maior afastamento do ponto $x = 1$ e $y = 1$), como também a dispersão dos pontos ao redor das linhas de tendência, visivelmente maior no gráfico **16a**, principalmente para níveis de contagem mais baixos. À temperatura ambiente, a dispersão entre os pontos é maior para contagens intermediárias do que para contagens altas de *E.coli* O157:H7. Entretanto, essa dispersão é menor para contagens baixas dessa bactéria. Esse fato poderia ser atribuído ao pequeno número de amostras nessa faixa de contagem, uma vez que, conforme descrito anteriormente, ocorreu um aumento nas contagens após 24 e 48 horas de armazenamento à temperatura ambiente.

Os gráficos **17a** e **17b** ilustram os logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 obtidas através do Petrifilm™ Kit-HEC frente aos logaritmos daquelas obtidas por meio de ágar MacConkey-sorbitol nos experimentos de desafio com *Pseudomonas* spp. em carne mantida em temperatura de refrigeração (**17a**) e em temperatura ambiente (**17b**). À temperatura ambiente, os parâmetros da linha de tendência (gráfico **17b**) revelaram-se bastante semelhantes aos obtidos na presença de *E.coli* não patogênica (gráfico **16b**), com índices de correlação e equações das respectivas retas bastante semelhantes. Já à temperatura de refrigeração (gráfico **17a**), os parâmetros revelaram um maior índice de correlação e uma maior equivalência entre as contagens obtidas através das duas metodologias, quando comparados aos experimentos de desafio contra *E.coli* não patogênica (gráfico **16a**).

Os gráficos **18a** e **18b** reúnem os logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 obtidas por intermédio do Petrifilm™ Kit-HEC confrontados com os logaritmos das contagens do patógeno no ágar MacConkey-sorbitol, após a inoculação simultânea de *Leuconostoc* spp. É interessante notar que, enquanto o gráfico **18b** revela o maior valor de R^2 dentre aqueles obtidos nos diversos grupos de experimentos realizados (0,996) e uma equação de reta com valores de “a” e “b” praticamente iguais a um e zero, respectivamente, o gráfico **18a** revela o menor valor de R^2 de todos os grupos de experimentos (0,75), com uma equação de reta um pouco mais afastada da condição “ideal”, em relação aos outros grupos de experimentos.

Os gráficos **19a** e **19b** reúnem todos os experimentos com carne armazenada em temperatura de refrigeração e em temperatura ambiente, respectivamente. O gráfico **20**, por sua vez, reúne os logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 de todos os experimentos de desafio realizados neste trabalho. Através da análise desses gráficos, pode-se concluir que o índice de correlação entre o Petrifilm™ Kit HEC e o ágar MacConkey-sorbitol foi bastante alto, chegando a 97,2% . Os experimentos que mais contribuíram para esse alto índice de correlação foram aqueles com armazenamento à temperatura ambiente ($R = 99,0\%$). Embora inferior, o índice de correlação entre as metodologias de contagem dos experimentos com armazenamento à temperatura de refrigeração também foi bastante alto (94,9%). A reunião dos logaritmos de todas as contagens de EHEC, de todos os experimentos realizados (gráfico **20**), resultou numa linha de tendência passando muito próxima ao ponto $x = 1$ e $y = 1$ (valores de “a” e “b” praticamente iguais a um e zero, respectivamente), reflexo de contagens da mesma ordem de grandeza através das duas metodologias, e com pontos relativamente equidistantes da linha de tendência. A dispersão observada entre os diversos pontos foi maior para valores intermediários e baixos de contagem (gráfico **20**), sendo que essa dispersão foi bem menor nos experimentos à temperatura ambiente (gráfico **19b**), em relação aos experimentos à temperatura de refrigeração (gráfico **19a**).

Assim sendo, o Petrifilm™ Kit-HEC revelou um alto índice de correlação com o ágar MacConkey-sorbitol e contagens da mesma ordem de grandeza. É interessante observar que esse índice de correlação foi particularmente alto nos experimentos onde a carne moída inoculada foi armazenada à temperatura ambiente.

Os gráficos **21** a **25** confrontam os logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 obtidas no Petrifilm™ para *E.coli* (Petrifilm™ EC) com os logaritmos daquelas obtidas no ágar MacConkey-sorbitol. A confecção dos referidos gráficos teve o intuito de comparar as contagens inicialmente obtidas através dos dois diferentes métodos utilizados, uma vez que a contagem no Petrifilm™ Kit-HEC é a confirmação da contagem inicialmente obtida no Petrifilm™ EC.

Assim como ocorreu na comparação entre as contagens obtidas no Petrifilm™ Kit-HEC e as obtidas por meio do ágar MacConkey-sorbitol, os gráficos **21a**, **21b**, **22a**, **22b**, **23a** e **23b** mostram que os experimentos à temperatura ambiente revelaram um maior índice de correlação entre as contagens de EHEC obtidas no Petrifilm™ EC e no ágar MacConkey-sorbitol, em relação aos experimentos à temperatura de refrigeração. Também nesses gráficos, a contagem de *E.coli* O157:H7 na presença de *Leuconostoc* spp. revelou um maior e um menor índice de correlação nos experimentos à temperatura ambiente ($R = 99,8\%$) e nos à temperatura de refrigeração ($R = 89,6\%$), respectivamente. Neste caso, os experimentos à temperatura de refrigeração (gráficos **21a**, **22a** e **23a**) revelaram linhas de tendência bastante afastadas do ponto $x = 1$ e $y = 1$, conforme também poderá ser constatado através da análise das equações das retas. Os experimentos à temperatura ambiente (gráficos **21b**, **22b** e **23b**), por outro lado, revelaram linhas de tendência passando nos ou bem próximas dos pontos $x = 1$ e $y = 1$.

Entretanto, considerando-se todos os experimentos à temperatura de refrigeração (gráfico **24a**), a linha de tendência passa exatamente pelo ponto $x = 1$ e $y = 1$, conforme poderá ser constatado, também, através da análise da equação da reta. Esse fato pode ser explicado pela compensação da maior

proximidade da linha de tendência ao eixo relativo ao logaritmo das contagens no ágar MacConkey-sorbitol em alguns experimentos pela maior proximidade da linha de tendência ao eixo relativo ao logaritmo das contagens no Petrifilm™ EC em outros. Por outro lado, o gráfico **24b**, que agrupa todos os experimentos à temperatura ambiente, mostra um maior desvio da linha de tendência do ponto $x = 1$ e $y = 1$, em relação a cada grupo de experimentos (gráficos **21b**, **22b** e **23b**).

O gráfico **25** reúne todos os experimentos realizados e mostra um alto valor de R^2 (0,9512) e uma linha de tendência passando bastante próxima do ponto $x = 1$ e $y = 1$. Assim sendo, as contagens no Petrifilm™ EC revelaram alto índice de correlação com as contagens efetuadas no ágar MacConkey-sorbitol.

Finalizando as comparações entre metodologias, os gráficos **26** a **30** confrontam os logaritmos das contagens de *E.coli* O157:H7 confirmadas no Petrifilm™ Kit-HEC com os logaritmos das contagens dessa bactéria inicialmente obtidas no Petrifilm™ EC. Essa comparação teve por objetivo ter uma idéia sobre a sensibilidade do kit em detectar colônias de *E.coli* O157:H7 presentes no Petrifilm™, uma vez que o Kit-HEC é executado a partir do próprio Petrifilm™ EC, conforme mencionado anteriormente.

Os gráficos **26a**, **26b**, **27a**, **27b**, **28a** e **28b** revelam que, independentemente do microrganismo simultaneamente inoculado nas amostras de carne moída, o índice de correlação entre as duas metodologias revelou-se muito alto, sendo que o menor deles foi de 98,9% ($R^2 = 0,9782$), para os experimentos de desafio contra *Pseudomonas* spp. com armazenamento à temperatura de refrigeração. Mais uma vez, os experimentos à temperatura ambiente (gráficos **26b**, **27b** e **28b**) resultaram em linhas de tendência passando pelo ponto $x = 1$ e $y = 1$ ou muito próximas a esse ponto, enquanto aqueles à temperatura de refrigeração revelaram linhas de tendência ligeiramente afastadas desse ponto. Analisando-se os referidos gráficos, observa-se uma dispersão muito menor dos diferentes pontos, em relação aos outros dois grupos de gráficos de comparação entre metodologias. Essa

observação está de acordo com o que é esperado, uma vez que na comparação em questão, uma metodologia de contagem é feita a partir da outra.

Os gráficos **29a** e **29b** revelam que, de maneira geral, tanto nos experimentos à temperatura de refrigeração quanto à temperatura ambiente, os índices de correlação entre o Petrifilm™ EC e o Petrifilm™ Kit-HEC revelaram-se muito altos (99,1% e 99,8% , respectivamente), com as linhas de tendência passando praticamente pelo ponto $x = 1$ e $y = 1$. Essas observações são confirmadas pelo gráfico **30**, onde a reunião de todos os experimentos realizados resultou em um valor de R^2 de 0,9899, com uma linha de tendência passando pelo ponto $x = 1$ e $y = 1$, com valores de “a” e “b” da equação da reta praticamente iguais a um e a zero, respectivamente.

Assim sendo, o Kit-HEC revelou-se bastante preciso na confirmação das contagens de *E.coli* O157:H7 efetuadas no Petrifilm™ EC. Na prática, a sensibilidade desse kit foi tal que, em alguns casos onde a formação de gás nas colônias vermelhas não era visível no Petrifilm™ EC devido ao grande número de colônias presentes, havia formação de pontos escuros na membrana do Kit-HEC, sendo que as colônias de origem eram posteriormente confirmadas como sendo *E.coli* O157:H7 através de testes bioquímicos e sorológicos a partir das colônias no Petrifilm™ EC, localizadas por sobreposição da membrana do Kit-HEC. Entretanto, deve ser salientado que, embora neste trabalho o Kit-HEC tenha sido utilizado na confirmação das contagens obtidos a partir do Petrifilm™ EC, o mesmo foi elaborado no sentido de detectar *E.coli* O157 presuntivamente, havendo necessidade de confirmação bioquímica e sorológica posterior.

Considerando-se as comparações entre metodologias realizadas no presente trabalho, pode-se dizer que, para a obtenção de contagens de *E.coli* O157:H7 a partir das amostras de carne moída inoculada com diferentes concentrações desse patógeno, o Petrifilm™ Kit-HEC e o próprio Petrifilm™ EC revelaram altos índices de correlação, com contagens da mesma ordem de

grandeza, quando comparado ao ágar MacConkey-sorbitol. Pode-se dizer, também, que as contagens de EHEC obtidas nos Petrifilm™ Kit-HEC foram praticamente uma confirmação total daquelas obtidas nos Petrifilm™ EC de origem.

Tendo em vista a importância da presença de *E.coli* O157:H7 em alimentos, um número crescente de métodos rápidos de determinação desse patógeno têm sido descritos (TORTORELLO & STEWART, 1994; MENG et al., 1994; JOHNSON et al., 1995; WEAGANT et al., 1995; DENG & FRATAMICO, 1996; HUANG & CHANG, 1996; RESTAINO et al., 1996; RESTAINO et al., 1997; INGRAM et al., 1997). No presente trabalho, o método rápido Petrifilm™ Kit-HEC revelou um alto índice de correlação com a metodologia convencional, utilizando o ágar MacConkey-sorbitol, índice de correlação que foi particularmente alto nos experimentos com carne armazenada à temperatura ambiente. Baseado nessas observações, inéditas até então, e no fato de se tratar de um método bastante sensível, simples e rápido, recomenda-se a utilização do Petrifilm™ Kit-HEC para a determinação presuntiva de *E.coli* O157:H7 em carne bovina.

Na revisão de literatura, observou-se que são poucos os trabalhos de avaliação de desempenho do Petrifilm™ Kit-HEC. CALICCHIA et al. (1994), com o objetivo de verificar se era possível quantificar *E.coli* O157:H7 através da utilização do Petrifilm™ Kit-HEC sem o enriquecimento prévio das amostras, inocularam diversos tipos de alimentos e dois tipos diferentes de superfície com essa bactéria. Os pesquisadores obtiveram uma recuperação média do patógeno de 74,8% para os alimentos e de 116,3% para as superfícies. Segundo os autores, a recuperação média de *E.coli* O157:H7 revelou-se maior para as amostras de fruta (96,2%) e de frutos do mar (95,4%) e menor para as amostras de carnes (56,7%), as quais constaram de carne bovina moída e de frango. Os autores concluíram que o Petrifilm™ Kit-HEC revelou-se um método rápido e efetivo para a quantificação de *E.coli* O157:H7 a partir de Petrifilm™ EC

e que essa enumeração era possível em produtos contendo coliformes na faixa de até 40.000 UFC/g, como parte de sua microbiota contaminante.

Posteriormente, BENNETT et al. (1995) observaram que o Petrifilm™ Kit-HEC, assim como o kit EHEC-TEK™ O157 (Organon Teknika), apresentaram um bom desempenho, quando comparados a métodos tradicionais, incluindo o ágar MacConkey-sorbitol e o ágar MacConkey-sorbitol adicionado de cefixima e de telurito de potássio. Os autores verificaram que ambos os métodos imunológicos detectavam baixos níveis de células após enriquecimento, com o tempo de análise ficando reduzido de um dia.

Em um estudo de investigação de surto de origem alimentar por *E.coli* O157:H7 atribuído a hambúrgueres subcozidos, JOHNSON, J.L. et al. (1995) descreveram a utilização do Petrifilm™ Kit-HEC (“direct blot ELISA”), como método adotado pelo “Food Safety and Inspection Service” (FSIS) dos Estados Unidos, paralelamente ao ensaio tipo “dipstick”. Os autores relataram o isolamento de *E.coli* O157:H7 (após enriquecimento em TSB modificado ou caldo EC modificado com novobiocina) de 44 das 45 amostras de hambúrguer e de carne bovina onde esse patógeno estava presente, por intermédio de ambos os métodos empregados.

Recentemente, GRIF et al. (1997) relataram que a utilização conjunta da técnica de separação imunomagnética e do Petrifilm™ Kit-HEC para a detecção de *E.coli* O157 a partir de carne moída resultou em sensibilidade de 100% e especificidade de 80,3%. Por outro lado, os autores obtiveram sensibilidade de 19% e especificidade de 85,6% para o sistema de ensaio imunodiagnóstico Vitek™ (VIDAS *E.coli* O157; BioMérieux) e sensibilidade de 31,3% e especificidade de 86,4% para o VIP^R (BioControl Systems). Os autores analisaram um total de 153 amostras de carne moída, 21 das quais naturalmente contaminadas e a semeadura no Petrifilm™ foi feita após enriquecimento em caldo EC modificado com novobiocina (42°C por 6 horas), seguida de separação imunomagnética.

Paralelamente, AABO et al. (1997) descreveram os resultados de um estudo colaborativo de comparação de cinco métodos de detecção de *E.coli* O157 a partir de carne moída, todos eles feitos a partir do mesmo caldo de enriquecimento. Os métodos testados constaram de semeadura em ágar MacConkey-sorbitol com cefixima e telurito (CT-SMAC), separação imunomagnética seguida de semeadura em CT-SMAC, separação imunomagnética seguida da utilização do Petrifilm™ Kit-HEC, imunoensaio visual TECRA™ O157 e kit EHEC-TEK™. Os autores relataram que, para todos os níveis de inoculação empregados, não foram observadas diferenças significativas entre as metodologias testadas e que, a níveis de inoculação baixos, a maioria das amostras revelou-se positiva através da metodologia empregando a separação imunomagnética seguida do Petrifilm™ Kit-HEC.

1a: EHEC (10^6) x *E. coli* (zero = não inoculada) - refrigeração

1b: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^6) - refrigeração

1c: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^3) - refrigeração

1d: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^1) - refrigeração

1e: EHEC (10^3) x *E. coli* (zero = não inoculada) - refrigeração

1f: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^6) - refrigeração

Observação: Valores de contagens expressos em notações científicas, ou seja, $1,00 \times 10^2$ corresponde a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, $1,00 \times 10^4$ corresponde a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, $1,00 \times 10^6$ corresponde a $1,0 \times 10^6$ UFC/g e assim por diante. A origem do eixo correspondente às contagens inicia-se por um ($1,00 \times 10^0$) - escala logarítmica.

Gráficos 1a a 1f Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura de refrigeração.

1g: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^3) - refrigeração

1h: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^1) - refrigeração

1i: EHEC (10^1) x *E. coli* (zero = não inoculada) - refrigeração

1j: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^6) - refrigeração

1k: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^3) - refrigeração

1l: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^1) - refrigeração

Gráficos 1g a 1l Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura de refrigeração (continuação).

1m: EHEC (zero = não inoculada) x *E. coli* (10^6) - refrigeração

1n: EHEC (zero = não inoculada) x *E. coli* (10^3) - refrigeração

1o: EHEC (zero = não inoculada) x *E. coli* (10^1) - refrigeração

1p: Carne não inoculada - refrigeração

Gráficos 1m a 1p Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura de refrigeração (continuação).

2a: EHEC (10^6) x *E. coli* (zero = não inoculada)-temperatura ambiente

2b: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^6) - temperatura ambiente

2c: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^3) - temperatura ambiente

2d: EHEC (10^6) x *E. coli* (10^1) - temperatura ambiente

2e: EHEC (10^3) x *E. coli* (zero = não inoculada)

2f: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^6) - temperatura ambiente

Observação: Valores de contagens expressos em notações científicas, ou seja, $1,00 \times 10^2$ corresponde a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, $1,00 \times 10^4$ corresponde a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, $1,00 \times 10^6$ corresponde a $1,0 \times 10^6$ UFC/g e assim por diante. A origem do eixo correspondente às contagens inicia-se por um ($1,00 \times 10^0$) - escala logarítmica.

Gráficos 2a a 2f Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura ambiente.

2g: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^3) - temperatura ambiente

2h: EHEC (10^3) x *E. coli* (10^1) - temperatura ambiente

2i: EHEC (10^1) x *E. coli* (zero - não inoculada) - temperatura ambiente

2j: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^6) - temperatura ambiente

2k: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^3) - temperatura ambiente

2l: EHEC (10^1) x *E. coli* (10^1) - temperatura ambiente

Gráficos 2g a 2l Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura ambiente (continuação).

**2m: EHEC (zero = não inoculada) x
E. coli (10^6)-temperatura ambiente**

**2n: EHEC (zero = não inoculada) x
E. coli (10^3) - temperatura ambiente**

**2o: EHEC (zero = não inoculada) x
E. coli (10^1) - temperatura ambiente**

**2p: Carne não inoculada -
temperatura ambiente**

Gráficos 2m a 2p Multiplicação de EHEC O157:H7 e *E. coli* não patogênica simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g), em temperatura ambiente (continuação).

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 3 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10⁶ UFC/g) na presença de *E. coli* não patogênica (inóculos zero, c.a. 10¹, c.a. 10³ e c.a. 10⁶ UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

Gráfico 4 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10³ UFC/g) na presença de *E. coli* não patogênica (inóculos zero, c.a. 10¹, c.a. 10³ e c.a. 10⁶ UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 5 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^1 UFC/g) na presença de *E. coli* não patogênica (inóculos zero, c.a. 10^1 , c.a. 10^3 e c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

6a: EHEC (10^6) x *Pseudomonas* spp. (autóctone) - refrigeração

6b: EHEC (10^6) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - refrigeração

6c: EHEC (10^6) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - refrigeração

6d: EHEC (10^3) x *Pseudomonas* spp. (autóctone) - refrigeração

6e: EHEC (10^3) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - refrigeração

6f: EHEC (10^3) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - refrigeração

Observação: Valores de contagens expressos em notações científicas, ou seja, 1,00E+02 corresponde a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, 1,00E+04 corresponde a $1,0 \times 10^4$ UFC/g e assim por diante. A origem do eixo correspondente às contagens inicia-se por um ($1,00E+00$) - escala logarítmica.

Gráficos 6a a 6f Multiplicação de EHEC O157:H7 e *Pseudomonas* spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g de EHEC e zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de *Ps. putida*), em temperatura de refrigeração.

6g: EHEC (10^1) x *Pseudomonas* spp. (autóctone) - refrigeração

6h: EHEC (10^1) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - refrigeração

6i: EHEC (10^1) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - refrigeração

6j: EHEC (zero = não inoculada) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - refriger.

6k: EHEC (zero = não inoculada) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - refriger.

6l: EHEC (zero = não inoculada) x *Pseudomonas* spp. (autóctone) - refrigeração

Gráficos 6g a 6l Multiplicação de EHEC O157:H7 e *Pseudomonas* spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g de EHEC e zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de *Ps. putida*), em temperatura de refrigeração (continuação).

7a: EHEC (10^6) - temperatura ambiente

7b: EHEC (10^6) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - temperatura ambiente

7c: EHEC (10^6) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - temperatura ambiente

7d: EHEC (10^3) - temperatura ambiente

7e: EHEC (10^3) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - temperatura ambiente

7f: EHEC (10^3) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - temperatura ambiente

Gráficos 7a a 7f Multiplicação de EHEC O157:H7 e *Pseudomonas* spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g de EHEC e zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de *Ps. putida*), em temperatura ambiente.

7g: EHEC (10^1) - temperatura ambiente

7h: EHEC (10^1) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - temperatura ambiente

7i: EHEC (10^1) x *Pseudomonas* (10^3) - temperatura ambiente

7j: EHEC (zero = não inoculada) x *Pseudomonas* spp. (10^6) - temperatura ambiente

7k: EHEC (zero = não inoculada) x *Pseudomonas* spp. (10^3) - temperatura ambiente

7l: carne não inoculada - temperatura ambiente

Gráficos 7g a 7l Multiplicação de EHEC O157:H7 e *Pseudomonas* spp. simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 , c.a. 10^3 e c.a. 10^1 UFC/g de EHEC e zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de *Ps. putida*), em temperatura ambiente (continuação).

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 8 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^6 UFC/g) na presença de *Pseudomonas putida* (inóculos zero, c.a. 10^3 e c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 9 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^3 UFC/g) na presença de *Pseudomonas putida* (inóculos zero, c.a. 10^3 e c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 10 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^1 UFC/g) na presença de *Pseudomonas putida* (inóculos zero, c.a. 10^3 e c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

11a: EHEC (10^6) x bactéria láctica (autóctone) - refrigeração

11b: EHEC (10^6) x bactéria láctica (10^6) - refrigeração

11c: EHEC (10^3) x bactéria láctica (autóctone) - refrigeração

11d: EHEC (10^3) x bactéria láctica (10^6) - refrigeração

11e: EHEC (zero = não inoculada) x bactéria láctica (10^6) - refriger.

11f: carne não inoculada - refrigeração

Observação: Valores de contagens expressos em notações científicas, ou seja, $1,00 \times 10^2$ corresponde a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, $1,00 \times 10^4$ corresponde a $1,0 \times 10^4$ UFC/g e assim por diante. A origem do eixo correspondente às contagens inicia-se por um ($1,00 \times 10^0$) - escala logarítmica.

Gráficos 11a a 11f Multiplicação de EHEC O157:H7 e de bactérias lácticas simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de EHEC e zero e c.a. 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp.), em temperatura de refrigeração.

12a: EHEC (10^6) x bactéria láctica (autóctone) - temperatura ambiente

12b: EHEC (10^6) x bactéria láctica (10^6) - temperatura ambiente

12c: EHEC (10^3) x bactéria láctica (autóctone) - temperatura ambiente

12d: EHEC (10^3) x bactéria láctica (10^6) - temperatura ambiente

12e: EHEC (zero = não inoculada) x bactéria láctica (10^6) - temperatura ambiente

12f: carne não inoculada - temperatura ambiente

Observação: Valores de contagens expressos em notações científicas, ou seja, 1,00E+02 corresponde a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, 1,00E+04 corresponde a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, 1,00E+06 corresponde a $1,0 \times 10^6$ UFC/g e assim por diante. A origem do eixo correspondente às contagens inicia-se por um (1,00E+00) - escala logarítmica.

Gráficos 12a a 12f Multiplicação de EHEC O157:H7 e de bactérias lácticas simultaneamente inoculados em carne moída (inóculos zero, c.a. 10^6 e c.a. 10^3 UFC/g de EHEC e zero e c.a. 10^6 UFC/g de *Leuconostoc* spp.), em temperatura ambiente.

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráfico 13 Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^3 e c.a. 10^6 UFC/g) na presença de *Leuconostoc* spp. (inóculos zero e c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura ambiente e de refrigeração.

Gráficos 14a e 14b Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^6 UFC/g) sem e com a presença de *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. (*Ps. putida*) ou bactéria láctica (*Leuconostoc* spp.) (inóculo c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura de refrigeração (**14a**) e ambiente (**14b**).

15a: EHEC (10^3) sem e com a presença de *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e bactéria láctica (10^6) - refrigeração

contagem de EHEC (UFC/g)

15b: EHEC (10^3) sem e com a presença de *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e bactéria láctica (10^6) - temperatura ambiente

contagem de EHEC (UFC/g)

Gráficos 15a e 15b Multiplicação de EHEC O157:H7 (inóculo c.a. 10^3 UFC/g) sem e com a presença de *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. (*Ps. putida*) ou bactéria láctica (*Leuconostoc* spp.) (inóculo c.a. 10^6 UFC/g) em temperatura de refrigeração (15a) e ambiente (15b).

16a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *E. coli* não patogênica, refrigeração

16b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *E. coli* não patogênica, temperatura ambiente

Gráficos 16a e 16b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica e mantidas em refrigeração (**16a**) e em temperatura ambiente (**16b**).

17a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Pseudomonas* spp., refrigeração

17b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Pseudomonas* spp., temperatura ambiente

Gráficos 17a e 17b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Pseudomonas putida* e mantidas em refrigeração (17a) e em temperatura ambiente (17b).

18a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Leuconostoc* spp., refrigeração

18b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Leuconostoc* spp., temperatura ambiente

Gráficos 18a e 18b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Leuconostoc* spp. e mantidas em refrigeração (**18a**) e em temperatura ambiente (**18b**).

19a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - todos os experimentos à temperatura de refrigeração

19b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™Kit-HEC - todos os experimentos à temperatura ambiente

Gráficos 19a e 19b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração (19a) e em temperatura ambiente (19b).

Gráfico 20 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente.

21a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™ EC - EHEC x *E.coli* não patogênica, refrigeração

21b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™ EC - EHEC x *E. coli* não patogênica, temperatura ambiente

Gráficos 21a e 21b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™ EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica e mantidas em refrigeração (21a) e em temperatura ambiente (21b).

22a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - EHEC x *Pseudomonas* spp., refrigeração

22b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - EHEC x *Pseudomonas* spp., temperatura ambiente

Gráficos 22a e 22b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Pseudomonas putida* e mantidas em refrigeração (**22a**) e em temperatura ambiente (**22b**).

23a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - EHEC x *Leuconostoc* spp., refrigeração

23b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - EHEC x *Leuconostoc* spp., temperatura ambiente

Gráficos 23a e 23b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Leuconostoc* spp. e mantidas em refrigeração (23a) e em temperatura ambiente (23b).

24a: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - todos os experimentos à temperatura de refrigeração

24b: Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC - todos os experimentos à temperatura ambiente

Gráficos 24a e 24b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração (24a) e em temperatura ambiente (24b).

Ágar Mac Conkey-Sorbitol x Petrifilm™EC- todos os experimentos

Gráfico 25 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em ágar Mac Conkey-sorbitol e em Petrifilm™EC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente.

26a: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *E. coli* não patogênica, refrigeração

26b: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *E. coli* não patogênica, temperatura ambiente

Gráficos 26a e 26b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica e mantidas em refrigeração (**26a**) e em temperatura ambiente (**26b**).

27a: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Pseudomonas* spp., refrigeração

27b: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Pseudomonas* spp., temperatura ambiente

Gráficos 27a e 27b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Pseudomonas putida* e mantidas em refrigeração (27a) e em temperatura ambiente (27b).

28a: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Leuconostoc* spp., refrigeração

28b: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - EHEC x *Leuconostoc* spp., temperatura ambiente

Gráficos 28a e 28b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *Leuconostoc* spp. e mantidas em refrigeração (28a) e em temperatura ambiente (28b).

29a: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - todos os experimentos à temperatura de refrigeração

29b: Petrifilm™EC x Petrifilm™Kit-HEC - todos os experimentos à temperatura ambiente

Gráficos 29a e 29b Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração (29a) e em temperatura ambiente (29b).

Gráfico 30 Logaritmos das contagens de EHEC O157:H7 em Petrifilm™EC e em Petrifilm™Kit-HEC nas amostras de carne simultaneamente inoculadas com EHEC (inóculos zero, 10^1 , 10^3 ou 10^6 UFC/g) e com *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* ou *Leucostoc* spp. e mantidas em refrigeração ou em temperatura ambiente.

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como principal meta investigar o efeito de alguns componentes da microflora da carne sobre a multiplicação de *E. coli* O157:H7 em carne bovina moída. Os resultados dessa investigação mostraram que a multiplicação de diversas concentrações desse patógeno não foi alterada pela presença de diversas concentrações de *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas* spp. e *Leuconostoc* spp., isolados de carne, quando a carne inoculada era armazenada sob temperatura de abuso de refrigeração e quando a mesma era armazenada à temperatura ambiente. Assim sendo, a não ocorrência de surtos por *E. coli* O157:H7 no Brasil até o presente momento e a existência de um único relato de isolamento desse patógeno a partir de fezes de dois bezerros, de fazendas diferentes (CERQUEIRA et al., 1997), aparentemente não está relacionado a dificuldades de competição com a microflora naturalmente presente em carne bovina.

Paralelamente, o Petrifilm™ Kit-HEC revelou-se um método sensível e rápido no acompanhamento das contagens de *E. coli* O157:H7 após diferentes tempos de armazenamento da carne inoculada à temperatura de abuso de refrigeração e à temperatura ambiente. Esse método rápido resultou em altos índices de correlação com o ágar MacConkey-sorbitol, ambos com contagens da mesma ordem de grandeza, sendo recomendável a sua utilização como metodologia de identificação presuntiva de *E. coli* O157:H7.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- AABO, S., BOEL, J., MARIAGER, B., JACOBSEN, B. Comparison of methods for detection of *Escherichia coli* O157 in raw meat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.38, Resumo n.V186/II.
- ABDUL-RAOUF, U.M., BEUCHAT, L.R., AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.7, p.1999-2006, 1993a.
- ABDUL-RAOUF, U.M., BEUCHAT, L.R., AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.8, p.2364-2368, 1993b.
- AHMED, S., COWDEN, J. An outbreak of *E. coli* O157 in central Scotland. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.22, Resumo n.V191/I.
- AMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS Jr., J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiol. Rev.**, Warsaw, v.18, n.1, p.29-51, 1996.

* De acordo com a NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1996.

ANSAY, S.E., DARLING, K.A., KARPAN, C.W. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef patties during frozen and refrigerated storage. In: GENERAL MEETING of the AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 97, Miami Beach, 1997. **Posters n.55**, p.437, P2.

BAGI, L.K., BUCHANAN, R.L. Microbial competition: suppression of *Listeria monocytogenes* growth by *Pseudomonas fluorescens*. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, suppl., p.17, 1996.

BAUDRY, B., SAVARINO, S.J., VIAL, P., KAPER, J.B., LEVINE, M.M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.161, n.6, p.1249-1251, 1990.

BELL, B.P., GOLDOFT, M., GRIFFIN, P.M., DAVIS, M.A., GORDON, D.C., TARR, P.I., BARTLESON, C.A., LEWIS, J.H., BARRETT, T.J., WELLS, J.G., BARON, R., KOBAYASHI, J. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.272, n.17, p.1349-1353, 1994.

BENNETT, A.R., MacPHEE, S., BETTS, R.P. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.20, p.375-379, 1995.

BESSER, R.E., LETT, S.M., WEBER, J.T., DOYLE, M.P., BARRETT, T.J., WELLS, J.G., GRIFFIN, P.M. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.269, n.17, p.2217-2220, 1993.

- BEUTIN, L., ALEKSIC, S., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Med. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v.183, p.13-21, 1994.
- BILGE, S.S., CLAUSEN, C.R., LAU, W., MOSELEY, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, Washington, v.171, n.8, p.4281-4289, 1989.
- BOOR, K.J. Survival of *E. coli* O157:H7 in fermented dairy products. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, suppl., p.60-61, 1996.
- BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.L., BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.33, n.1, p.103-120, 1996.
- BRANDT, J.R., FOUSER, L.S., WATKINS, S.L., ZELIKOVIC, I., TARR, P.I., NAZAR-STEWART, V., AVNER, E.D. *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.125, n.4, p.519-526, 1994.
- BRIDGEMAN, T.A., ZOTTOLA, E.A. Isolation and characterization of substances inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, suppl., p.42-43, 1996.
- CALICCHIA, M.L., REGER, J.D., WANG, C.I.N., OSATO, D.W. Direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 from Petrifilm™ EC count plates using the Petrifilm™ Test Kit-HEC without sample pre-enrichment. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.10, p.859-864, 1994.

CAPRIOLI, A., LUZZI, I., ROSMINI, F., PASQUINI, P., CIRRINCIONE, R., GIANVITI, A., MATTEUCCI, M.C., RIZZONI, G., the HUS Italian Study Group. Hemolytic-uremic syndrome and vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.166, p.154-158, 1992.

CARTER, A.O., BORCZYK, A.A., CARLSON, J.A.K., HARVEY, B., HOCKIN, J.C., KARMALI, M.A., KRISHNAN, C., KORN, D.A., LIOR, H. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.317, n.24, p.1496-1500, 1987.

CDC. (Centers for Disease Control and Prevention) Preliminary report: foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United States, 1993. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.269, n.9, p.1089, 1993a.

CDC. (Centers for Disease Control and Prevention) Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United States, 1992-1993. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.269, n.17, p.2194-2196, 1993b.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger - California, July 1993. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.271, n.15, p.1153-1154, 1994.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994. **MMWR Morb. Mort. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.44, n.9, p.159, 1995.

CERQUEIRA, A.M.F., GUTH, B.E.C., FARAGE, S., CORREA, E.A., JOAQUIM, R.M., LUZ, H.S., LIMA, M.P., PRADO, E.H.R.B., CRUZ, C.O., ANDRADE, J.R.C. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.28, Resumo n.V22/II.

CHAPMAN, P.A., SIDDON, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P., FOX, J., CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.111, n.3, p.439-447, 1993a.

CHAPMAN, P.A., WRIGHT, D.J., HIGGINS, R. Untreated milk as a source of verotoxigenic *E. coli* O157. **Vet. Rec.**, London, v.133, n.7, p.171-172, 1993b.

CHAMPOMIER-VERGÈS, M.C., RICHARD, J. Antibacterial activity among *Pseudomonas* strains of meat origin. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.18, p.18-20, 1994.

CHENG, C.M., DOYLE, M.P., LUCHANSKY, J.B. Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens. **J. Food Prot.**, Ames, v.58, n.12, p.1340-1344, 1995.

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

- CLARKE, R.C., McEWEN, S.A., GANNON, V.P., LIOR, H., GYLES, C.L.
Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in south-western Ontario. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.102, p.253-260, 1989.
- CONNER, D.E., , KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, n.1, p.382-385, 1995.
- CONTRINI, M.M., De ROSA, M.F., FURMANSKI, S., PARMA, A., SANZ, M., CANEPA, C., CLEARY, T.G., LÓPEZ, E.L. Epidemiology of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infections in Argentina. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.26, Resumo n.V225/I.
- CORDOVÉZ, A., PRADO, V., MAGGI, L., CORDERO, J., MARTINEZ, J., MISRAJI, A., RIOS, R., SOZA, G., OJEDA, A., LEVINE, M.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.8, p.2153-2157, 1992.
- CULLOR, J.S. *Escherichia coli* O157:H7: the silent danger. **Vet. Med.**, Edwardsville, v.90, p.74-82, 1995.
- CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R. Population reduction of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **J. Food Prot.**, Ames, v.58, n.9, p.977-983, 1995.

- DEL ROSARIO, B.A., BEUCHAT, L.R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. **J. Food Prot.**, Ames, v.58, n.1, p.105-107, 1995.
- DENG, M.Y., FRATAMICO, P.M. A multiplex PCR for rapid identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from foods. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.6, p.570-576, 1996.
- DOYLE, M.P., PADHYE, V.V. *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.235-281.
- DOYLE, M.P., SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.53, n.10, p.2394-2396, 1987.
- DOYLE, M.P., ZHAO, T., MENG, J., ZHAO, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p.171-191.
- DROSINOS, E.H., BOARD, R.G. Attributes of microbial associations of meat growing as xenic batch cultures in a meat juice at 4°C. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.26, n.3, p.279-293, 1995a.
- DROSINOS, E.H., BOARD, R.G. Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: sources of contamination with pseudomonads. **Food Microbiol.**, London, v.12, n.3, p.189-197, 1995b.
- DUNCAN, L., CARTER, A. Outbreak of gastrointestinal disease - Ontario. **J. Food Prot.**, Ames, v.50, p.438-439, 1987.

- DUNCAN, S.E., HACKNEY, C.R. Relevance of *Escherichia coli* O157.H7 to the dairy industry. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.14, n.11, p.656-660, 1994.
- ECKNER, K.F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.12, n.4., p.204-209, 1992.
- EWING, W.H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Science, 1986. 536p.
- FRAMPTON, E.W., RESTAINO, L. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.74, p.223-233, 1993.
- FRANCO, B.D.G.M., GOMES, T.A.T., JAKABI, M., MARQUES, L.R.M. Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.12, p.333-338, 1991.
- FREEDMAN, D.J., KONDO, J.K., WILLRETT, D.L. Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp.: a possible role for iron. **J. Food Prot.**, Ames, v.52, n.7, p.484-489, 1989.
- FUKUSHIMA, H., HASHIZUME, T., KITANI, T. The massive outbreak of *E. coli* O157 infections by foods poisoning among the elementary school children in Sakai, Japan in 1996. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.111, Resumo n.V6/VII.

GANNON, V.P.J., KING, R.K., KIM, J.Y., THOMAS, E.J.G. Rapid and sensitive method for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, n.12, p.3809-3815, 1992.

GANNON, V.P.J., RASHED, M., KING, R.K., THOMAS, E.J.G. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.5, p.1268-1274, 1993.

GARCÍA de FERNANDO, G.D., NYCHAS, G.J.E., PECK, M.W., ORDÓÑEZ, J.A. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, n.2, p.221-231, 1995.

GLYNN, K., CODY, S., CAIRNS, L., ALEXANDER, R., FYFE, M., SAMADPOUR, M., LEWIS, J., SWAMINATHAN, B., ABBOTT, S., HOFFMAN, R., KOBAYASHI, J., VUGIA, D., GRIFFIN, P. International outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with unpasteurized commercial apple juice. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.18, Resumo n.V147/I.

GOMES, T.A.T., RAMOS, S.R.T.S., RODRIGUES, D., RODRIGUE', D., RASSI, V., TOLEDO, M.R.F., VIEIRA, M.A.M., GATTI, S.V., HOLCK, P., GRIFFIN, P.M. Etiology of acute diarrhea in children 1 to 5 years old in São Paulo, Brazil. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 94. Las Vegas, 1994. **Abstracts**, p.543, C299.

- GRAM, L. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.7, p.2197-2203, 1993.
- GREER, G.G., DILTS, B.D. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.25, n.2, p.141-151, 1995.
- GRIF, K., DIERICH, M.P., ALLERBERGER, F. Dynabeads^R plus 3M Petrifilm-HEC^R: an improved screening method for detection of *E. coli* O157 from minced beef. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.30, Resumo n.V29/II.
- GUERRERO, I., MENDIOLEA, R., PONCE, E., PRADO, A., Inoculation of lactic acid bacteria on meat surfaces as a means of decontamination in semitropical conditions. **Meat Sci.**, London, v.40, n.3, p.397-411, 1995.
- GUNZER, F., BÖHM, H., RÜSSMANN, H., BITZAN, M., ALEKSIC, S., KARCH, H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.7, p.1807-1810, 1992.
- HANCOCK, D.D., BESSER, T.E., KINSEL, M.L., TARR, P.I., RICE, D.H., PAROS, M.G. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.113, n.2, p.199-207, 1994.

- HEUVELINK, A.E., WERNARS, K., de BOER, E. Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.12, p.1267-1272, 1996.
- HINKENS, J.C., FAITH, N.G., LORANG, T.D., BAILEY, P., BUEGE, D., KASPAR, C.W., LUCHANSKY, J.B. Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.12, p.1260-1266, 1996.
- HOFMANN, S.L. Southwestern Internal Medicine Conference: Shiga-like toxins in hemolytic-uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. **Am. J. Med. Sci.**, Thorofare, v.306, n.6, p.398-406, 1993.
- HUANG, S.W., CHANG, T.C. Specific identification of *Escherichia coli* O157 by an immunostick method using commercially available antibodies. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.6, p.670-674, 1996.
- INGRAM, D.T., RIGAKOS, C.G., ROLLINS, D., MALLINSON, E.T., CARR, L., LAMICHHANE, C., JOSEPH, S.W. Development and evaluation of a 24 hr method (*E. coli* SELeCT™) for the detection, isolation and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground meat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.39, Resumo n.V192/II.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbial ecology of foods: Food commodities.** Orlando: Academic Press, 1980. v.2, p.333-377.

JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.

JACKSON, T.C., ACUFF, G.R., DICKSON, J.S. Meat, poultry, and seafood. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**. Fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 1997. p.83-100.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 4. ed. New York: Chapman & Hall, 1992. p.202-203.

JEPPESEN, C. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.26, n.1, p.25-41, 1995.

JERSE, A.E., YU, J., TALL, B.D., KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.87, p.7839-7843, 1990.

JOHNSON, J.L., ROSE, B.E., SHARAR, A.K., RANSOM, G.M., LATTUADA, C.P., MCNAMARA, A.M. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. **J. Food Prot.**, Ames, v.58, n.6, p.597-603, 1995.

JOHNSON, R.P., CLARKE, R.C., WILSON, J.B., READ, S.C., RAHN, K., RENWICK, S.A., SANDHU, K.A., ALVES, D., KARMALI, M.A., LIOR, H., MCEWEN, S.A., SPIKA, J.S., GYLES, C.L. Growing concerns and recent outbreaks involving non O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.10, p.1112-1122, 1996.

- JOHNSON, R.P., DURHAM, R.J., JOHNSON, S.T., MacDONALD, L.A., JEFFREY, S.R., BUTMAN, B.T. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, n.1, p.386-388, 1995.
- JOHNSTON, R.W., TOMPKIN, R.B. Meat and poultry products. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.821-835.
- KALCHAYANAND, N., HANLIN, M.B., RAY, B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.15, p.239-243, 1992.
- KARCH, H., BÖHM, H., SCHMIDT, H., GUNZER, F., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.5, p.1200-1205, 1993.
- KASPAR, C.W., LUCHANSKY, J.B. Validation of processes for control of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented sausage. **J. Food Prot.**, Ames, v.59 (Suppl.), p.30, 1996.
- KATLA, T., HAGEN, B.F., AXELSSON, L., MATFORSK, H.B. Intrinsic factors affecting diffusion of bacteriocins. In: GENERAL MEETING of the AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 97. Miami Beach, 1997. **Posters n.55**. p.444, P45.

- KEENE, W.E., McANULTY, J.M., HOESLY, F.C., WILLIAMS Jr, P., HEDBERG, K., OXMAN, G.L., BARRETT, T.J., PFALLER, M.A., FLEMING, D.W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, n.9, p.579-584, 1994.
- KIM, M.S., DOYLE, M.P. Dipstick Immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, n.5, p.1764-1767, 1992.
- KIM, W.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Rev. Int.**, New York, v.9, n.2, p.299-313, 1993.
- KIROV, S.M., ANDERSON, M.J., McMEEKIN, T.A. A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.68, p.327-334, 1990.
- KNIGHT, P. Hemorrhagic *E. coli*: the danger increases. **Am. Soc. Microbiol. News**, Washington, v.59, n.5, p.247-250, 1993.
- LEISNER, J.J., GREER, G.G., DILTS, B.D., STILES, M.E. Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.26, n.2, p.231-243, 1995.
- LEVINE, M.M., XU, J., KAPER, J.B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.156, n.1, p.175-182, 1987.

- LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.
- LOPEZ, E.L., DIAZ, M., GRINSTEIN, S., DEVOTO, S., MENDILAHARZU, F., MURRAY, B.E., ASHKENAZI, S., RUBEGLIO, E., WOLOJ, M., VASQUEZ, M., TURCO, M., PICKERING, L.K., CLEARY, T.G. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.160, n.3, p.469-475, 1989.
- MAAS, R. An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. **Plasmid**, New York, v.10, p.296-298, 1983.
- MARCH, S.B., RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.23, n.5, p.869-872, 1986.
- MARTIN, M.L., SHIPMAN, L.D., WELLS, J.G., POTTER, M.E., HEDBERG, K., WACHSMUTH, I.K., TAUXE, R.V., DAVIS, J.P., ARNOLDI, J., TILLELI, J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, London, v.2, p.1043, 1986.
- MASSA, S., ALTIERI, C., QUARANTA, V., De PACE, R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.24, p.347-350, 1997.
- MENG, J., DOYLE, M.P., ZHAO, T., ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.5, p.179-185, 1994.

- MERMIN, J.H., HILBORN, E.D., VOETSCH, A., SWARTZ, M., LAMBERT-FAIR, M.A., FARRAR, J., VUGIA, D., HADLER, J., SLUTSKER, L. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating mesclun mix lettuce. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.9, Resumo n.V74/l.
- MILLER, L.G., KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.6, p.460-464, 1994.
- MILLEY, D.G., SEKLA, L.H. An enzyme-linked immunosorbent assay-based isolation procedure for verotoxigenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.12, p.4223-4229, 1993.
- MONTVILLE, T.J., WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**. Fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 1997. p.557-577.
- MORGAN, D., NEWMAN, C.P., HUTCHINSON, D.N., WALKER, A.M., ROWE, B., MAJID, F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with consumption of yoghurt. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.111, p.181-187, 1993.
- MORGAN, G.M., NEWMAN, C., PALMER, S.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.101, p.83-91, 1988.

- NATARO, J.P., BALDINI, M.M., KAPER, J.B., BLACK, R.E., BRAVO, N., LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.152, n.3, p.560-565, 1985.
- NEWLAND, J.W., NEILL, R.J. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.7, p.1292-1297, 1988.
- O'BRIEN, A.D., MELTON, A.R., SCHMITT, C.K., McKEE, M.L., BATTIS, M.L., GRIFFIN, D.E. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.10, p.2799-2801, 1993.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., BENNETT, B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **J. Food Prot.**, Ames, v.53, n.3, p.249-252, 1990a.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., MATNER, R. An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm™ test kit - HEC - for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, Ames, v.53, n.11, p.936-940, 1990b.
- PADHYE, N.V., DOYLE, M.P. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O26:H11. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.29, n.1, p.99-103, 1991a.

PADHYE, N.V., DOYLE, M.P. Rapid procedure for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.57, n.9, p.2693-2698, 1991b.

PHEBUS, R.K., THIPPAREDDI, H., KONE, K., FUNG, D.Y.C., KASTNER, C.L. Use of OxyraseRegistered enzyme in enrichments to enhance the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from culture media and ground beef. **J. Rapid Methods Automation Microbiol.**, Trumbull, v.1, n.4, p.249-260, 1993.

POLLARD, D.R., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROZEE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.3, p.540-545, 1990.

RASMUSSEN, M.A., CRAY Jr., W.C.C., CASEY, T.A., WHIPP, S.C. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.114, p.79-84, 1993.

REIDA, P., WOLFF, M., PÖHLS, H.W., KUHLMANN, W., LEHMACHER, A., ALEKSIC, S., KARCH, H., BOCKEMÜHL, J. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. **Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. Abt 1 Orig. A.**, Stuttgart, v.281, p.534-543, 1994.

REILLY, W.J., CARTER, F.T. Surveillance of *E. coli* O157 in Scotland. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.16, Resumo n.V128/I.

- RESTAINO, L., CASTILLO, H.J., STEWART, D., TORTORELLO, M.L. Antibody-direct epifluorescent filter technique and immunomagnetic separation for 10-h screening and 24-h confirmation of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.10, p.1072-1075, 1996.
- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., IRBE, R.M., ALLISON, D.R.K. A 5-h screening and 24-h confirmation procedure for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in beef using direct epifluorescent microscopy and immunomagnetic separation. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.24, p.401-404, 1997.
- RICE, E.W., JOHNSON, C.H., WILD, D.K., REASONER, D.J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.15, p.38-40, 1992.
- RILEY, L.W. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.41, p.383-407, 1987.
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.308, n.12, p.681-685, 1983.
- RODRIGUEZ, J.M., SOBRINO, O.J., MOREIRA, W.L., CINTAS, L.M., CASAUS, P., FERNÁNDEZ, M.F., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. Inhibition of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. **Meat Sci.**, London, v.37, p.305-313, 1994.

ROWE, P.C., ORRBINE, E., OGBORN, M., WELLS, G.A., WINTHER, W., LIOR, H., MANUEL, D., McLAINE, P.N. Epidemic *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome in a Canadian inuit community: intestinal illness in family members as a risk factor. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.124, n.1, p.21-26, 1994.

RYAN, C.A., TAUXE, R.V., HOSEK, G.W., WELLS, J.G., STOESZ, P.A., McFADDEN Jr., H.W., SMITH, P.W., WRIGHT, G.F., BLAKE, P.A. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.154, n.4, p.631-638, 1986.

SACK, R.B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.317, n.24, p.1535-1537, 1987.

SALMON, R.L., FARRELL, I.D., HUTCHISON, J.G.P., COLEMAN, D.J., GROSS, R.J., FRY, N.K., ROWE, B., PALMER, S.R. A christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.103, p.249-254, 1989.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach.** Washington: ASM Press, 1994. p.190-204.

SAMADPOUR, M., ONGERTH, J.E., LISTON, J., TRAN, N., NGUYEN, D., WHITTAM, T.S., WILSON, R.A., TARR, P.I. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.60, n.3, p.1038-1040, 1994.

- SANTOS, O., SCHWACH, T.S., ZOTTOLA, E.A. Competitive growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef at 9,5°C. **J. Food Prot.**, Ames, v.58 (Suppl.), p.19, 1995.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.7, p.158-164, 1996.
- SCHILLINGER, U., LÜCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiol.**, London, v.4, p.199-208, 1987.
- SCHOENI, J.L., DOYLE, M.P. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.60, n.8, p.2958-2962, 1994.
- SEMANCHECK, J.J., GOLDEN, D.A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during fermentation of apple cider. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.12, p.1256-1259, 1996.
- SILVA Jr., E.A. **Microrganismos totais e bacilos Gram-negativos psicrotróficos em amostras de carne fresca bovina moída comercializada na cidade de São Paulo.** São Paulo, 1985. 67p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
- SOUDAH, J., BOOR, K. The behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in fermentation systems with thermophilic and mesophilic dairy starter cultures. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, suppl., p.53, 1996.

- SPIKA, J.S., PARSONS, J.E., NORDENBERG, D., WELLS, J.G., GUNN, R.A., BLAKE, P.A. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.109, n.2, p.287-291, 1986.
- STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.10, p.763-766, 1992.
- STEWART, P.J. Hemorrhagic colitis in a home for the aged - Ontario. **Can. Dis. Wkly. Rep.**, Ottawa, v.9, p.182-184, 1983.
- STILES, M. E Potential for biological control of agents of foodborne disease. **Food Res. Int.**, Barking, v.27, p.245-250, 1994.
- SUTHIENKUL, O., BROWN, J.E., SERIWATANA, J., TIENTHONGDEE, S., SASTRAVAHA, S., ECHEVERRIA, P. Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.56, n.1, p.1135-1139, 1990.
- SZABO, R.A., TODD, E.C.D., JEAN, A. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. **J. Food Prot.**, Ames, v.49, n.10, p.768-772, 1986.
- TAKEDA, T., TANIMURA, M., YOSHINO, K., YAMAGATA, K., MATSUDA, E., UCHIDA, H., IKEDA, N. Questionnaire-based clinical aspects of VTEC infection in Japan, 1996. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN)-PRODUCING *Escherichia coli* INFECTIONS, 3, Baltimore, 1997. p.116, Resumo n.V219/VII.

- TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: overview of clinical and epidemiological issues. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.7, p.632-636, 1994.
- TODD, E.C.D., SZABO, R.A., PETERKIN, P., SHARPE, A.N., PARRINGTON, L., BUNDLE, D., GIDNEY, M.A.J., PERRY, M.B. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, n.10, p.2536-2540, 1988.
- TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. EPM - modificação do meio Rugai e Araujo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.13, n.4, p.309-315, 1982a.
- TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. MILi - um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.13, n.3, p.230-235, 1982b.
- TORTORELLO, M.L., STEWART, D.S. Antibody-direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.60, n.10, p.3553-3559, 1994.
- TOZZI, A.E., NICCOLINI, A., CAPRIOLI, A., LUZZI, I., MONTINI, G., ZACCHELLO, G., GIANVITI, A., PRINCIPATO, F., RIZZONI, G. A community outbreak of haemolytic-uremic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.113, p.209-219, 1994.

- VAN der WAL Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.17, p.381-399, 1995.
- WALLS, I., SCOTT, V.N. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, n.12, p.1331-1335, 1996.
- WANG, G., ZHAO, T., DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n.7, p.2567-2570, 1996.
- WATERS, J.R., SHARP, J.C.M., DEV, V.J. Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987-1991. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.19, p.834-843, 1994.
- WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L., BARK, D.H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.7, p.629-631, 1994.
- WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L., JINNEMAN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **J. Food Prot.**, Ames, v.58, n.1, p.7-12, 1995.
- WHITING, R., GOLDEN, M. A model for the interactions of temperature, pH, lactate, salt and nitrite on the survival of *E. coli* O157:H7. **J. Food Prot.**, Ames, v.59, suppl., p.51, 1996.
- WHITTAM, T.S., WOLFE, M.L., WACHSMUTH, K., ORSKOV, F., ORSKOV, I., WILSON, R.A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause

hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, Washington, v.58, n.4, p.352-356, 1993.

WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., ROBERTS, D., THIRLWELL, J., CHEASTY, T., ROWE, B. Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.75, p.420-426, 1993.

WILLSHAW, G.A., THIRLWELL, J., JONES, A.P., PARRY, S., SALMON, R.L., HICKEY, M. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.19, n.5, p.304-307, 1994.

ZHAO, T., DOYLE, M.P., BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.8, p.2526-2530, 1993.

VII. RESUMO

E. coli O157:H7 é um patógeno de importância em alimentos, tendo sido envolvido, nos últimos anos, em surtos de grandes proporções, principalmente por produtos cárneos. Entretanto sua ocorrência em alimentos, particularmente em carne crua, é baixa e poderia, eventualmente, ser atribuída à atividade antagônica expressa por outros microrganismos presentes. Assim sendo, foi avaliada a interferência de bactérias que fazem parte da microbiota normal de carne sobre a multiplicação de *E. coli* O157:H7 em carne bovina moída mantida em refrigeração e em temperatura ambiente. Com essa finalidade, foram realizados testes de desafio ("challenge tests") em porções de 25 g de carne bovina moída inoculadas com diferentes concentrações de *E. coli* O157:H7 (10^1 , 10^3 e 10^6 UFC/g), desafiadas com diferentes inóculos de *E. coli* não patogênica, *Pseudomonas putida* e *Leuconostoc* spp. As cepas de *Pseudomonas putida* e de *Leuconostoc* spp., isoladas de carne, foram selecionadas em função de atividade inibitória contra *E. coli* O157:H7 observada "in vitro". Para o monitoramento de *E. coli* O157:H7, foram utilizados o método convencional, ou seja, plaqueamento em ágar Mac Conkey-sorbitol e identificação de colônias (testes bioquímicos e sorológicos), bem como um método considerado rápido, empregando o Petrifilm™ Kit-HEC. De maneira geral, não foram observadas interferências significativas da presença de diferentes inóculos de *E. coli* não patogênica, *P. putida* e *Leuconostoc* spp., sobre a multiplicação de diferentes inóculos de *E. coli* O157:H7 à temperatura ambiente e à temperatura de refrigeração. Paralelamente, o Petrifilm™ Kit-HEC revelou um alto índice de correlação com o ágar Mac Conkey-sorbitol (97,2%), com contagens da mesma ordem de grandeza. Os experimentos à temperatura ambiente revelaram um maior índice de correlação (99,0%), quando comparados àqueles à temperatura de refrigeração (94,9%). Aparentemente, a baixa ocorrência de *E. coli* O157:H7 em alimentos, particularmente em carne

bovina crua, não pode ser atribuída à atividade antagônica de alguns microrganismos presentes.

Palavras-chave: *E. coli* O157:H7, EHEC, patógeno, antagonismo, carne bovina.

VIII. SUMMARY

Escherichia coli O157:H7 is a foodborne pathogen of increasing importance, since it has been involved in several threatening outbreaks, most of them associated with meat products. Though, it is possible that the low occurrence of *E. coli* O157:H7 in food, particularly in meat, may be due to antagonistic effects of other microorganisms present. Therefore, the influence of some bacteria isolated from meat, over *E. coli* O157:H7 in meat samples stored at chill and room temperatures was evaluated. For that purpose, studies were performed on 25 g of ground beef inoculated with different spiking levels of *E. coli* O157:H7 (10^1 , 10^3 and 10^6 CFC/g), challenged with different spiking levels of non pathogenic *E. coli*, *Pseudomonas putida* or *Leuconostoc* spp. The *Ps. putida* and *Leuconostoc* spp. strains were selected based on deferred antagonism observed against *E. coli* O157:H7. Multiplication was monitored by means of cultural methods, employing sorbitol Mac Conkey agar and additional identification tests, and the rapid method Petrifilm™ Kit-HEC. No significant influence of non pathogenic *E. coli*, *Pseudomonas putida* and *Leuconostoc* spp. over the multiplication of *E. coli* O157:H7 was observed. Results on Petrifilm™ Kit-HEC showed high correlation with results on sorbitol Mac Conkey agar (97,2%). Experiments performed with meat kept at room temperatures resulted in higher correlation values (99,0%), when compared to those of meat kept at chill temperatures (94,9%). Apparently, the low occurrence of *E. coli* O157:H7 in food, particularly in raw meat, can't be attributed to antagonistic effects of other bacteria from natural microflora.

Key words: *E. coli* O157:H7, EHEC, pathogen, antagonism, beef, meat.