

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUOROGÊNICO (MUG)
PARA ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli*
EM LEITE E DERIVADOS

LAERCIO GOULARTE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco

13/83
São Paulo
1992

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUOROGÊNICO (MUG)
PARA ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli*
EM LEITE E DERIVADOS

LAERCIO GOULARTE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco

São Paulo
1992

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Documentação do
conjunto das Químicas

Goularte, Laércio

G694a Avaliação do método fluorogênico (MUG) para
enumeração de Escherichia coli em leite e
seus derivados. São Paulo, 1992.
66p.

Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ali-
mentos e Nutrição Experimental da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da USP.
Orientador: Bernadette D. G. Melo Franco

1. Análise Microbiológica de Alimentos
2. Escherichia coli 3. Método fluorogênico
4. Método Rápido I. Franco, Bernadette D. G. Melo,
orientador II. t

576.163 - CDD 19. ed

Laercio Goularte

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUOROGÊNICO (MUG)
PARA ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli*
EM LEITE E DERIVADOS

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São paulo, 20 de NOV. de 1992.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

*Aos meus pais,
Antonio Goularte e Helena W. Goularte,
pelo carinho e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

- * À Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco, pela orientação, apoio e dedicação;

 - * À amiga Isabella Brancher, pelo apoio e companheirismo;

 - * À Profa. Dra. Mariza Landgraf, pelo apoio e dedicação;

 - * À Profa. Maria Teresa Destro, pelo apoio e dedicação;

 - * À Quimitra, na pessoa de Wagner Tredice , pela gentileza de fornecer os meios de cultura;

 - * Ao Instituto de Matemática e Estatística, na pessoa de Profa. Lizbet K. Cordani, pela orientação estatística;

 - * À Moema Rodrigues Santos, pela revisão das referências bibliográficas;

 - * À Adelia Peres Rabello pelo apoio técnico;

 - * Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;

 - * À Capes pela bolsa de estudos.
-

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1. Amostras	15
3.1.1. Leite cru	15
3.1.2. Queijo tipo Minas frescal	15
3.1.3. Leite pasteurizado tipo C.....	15
3.1.4. Sorvete.....	16
3.2. Materiais	16
3.2.1. Meios de cultura.....	16
3.2.2. Soluções e reativos	17
3.3. Métodos.....	17
3.3.1. Preparo das amostras.....	17
3.3.2. Método clássico dos tubos múltiplos para detecção de <i>Escherichia coli</i>	18
3.3.3. Método fluorogênico para detecção de <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.4. Identificação bioquímica.....	22
3.3.5. Contagem padrão em placas de bactérias mesófilas viáveis aeróbicas ou facultativas.....	22
3.3.6. Tratamento estatístico	23
4. Resultados e Discussão	25
5. Conclusões	53
6. Referências Bibliográficas	54
Resumo.....	65
Summary.....	66

SUMÁRIO (Figura e Tabelas)

Figura 01: Representação esquemática das técnicas clássica e fluorogênica para detecção de <i>Escherichia coli</i> em leite e derivados	21
Tabela 01: β -glucuronidase (GUA) produzida por cepas de <i>Escherichia coli</i> de diferentes origens	06
Tabela 02: Símbolos utilizados para a identificação dos tubos com resultados especiais observados no método fluorogênico	23
Tabela 03: Resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i> e de bactérias mesófilas em amostras de leite cru.....	40
Tabela 04: Resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i> e de bactérias mesófilas em amostras de queijo tipo Minas frescal	41
Tabela 05: Resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i> e de bactérias mesófilas em amostras de leite pasteurizado tipo C	42
Tabela 06: Resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i> e de bactérias mesófilas em de amostras de sorvete.....	43
Tabela 07: Análise de variância das médias das contagens de <i>Escherichia coli</i> obtidas pelas metodologias clássica, fluorogênica com leitura em 24h (MUG 24h) e fluorogênica com leitura em 48h (MUG 48h)	44
Tabela 08: Equivalência das médias das contagens de <i>Escherichia coli</i> obtidas pelas metodologias clássica e fluorogênica, em função do tipo de alimento e do nível de significância.....	45

Tabela 09: Relação entre o número de tubos fluorescentes antes e após a adição de NaOH 2N na detecção de <i>Escherichia coli</i> pelo Método Fluorogênico em amostras de leite e derivados.....	46
Tabela 10: Relação entre as leituras de turvação, produção de gás e de indol e fluorescência nos tubos com caldo LST-MUG e BVB-MUG e a recuperação de <i>Escherichia coli</i> (resultados em número de tubos)	47
Tabela 11: Comparação entre a leitura da fluorescência e a combinação das leituras da fluorescência e indol nos caldos de enriquecimento, na detecção de <i>Escherichia coli</i> pelo método fluorogênico	48
Tabela 12: Relação entre a quantidade de bactérias mesófilas e a ocorrência de respostas falso negativas no método fluorogênico.....	49
Tabela 13: Características fenotípicas das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de quatro grupos de alimentos.....	50
Tabela 14: Relação entre as respostas de turvação e produção de gás em caldo EC a 44,5 ^o C e o isolamento de <i>Escherichia coli</i> através da metodologia clássica dos tubos múltiplos em quatro grupo de alimentos	51
Tabela 15: Gêneros de bactérias isolados de caldo EC após incubação a 44,5 ^o C, após 24h.....	52

SIGLAS ADOTADAS NESTE TRABALHO

A-1 = meio A-1

AN = ágar nutriente

AN-MUG = ágar nutriente com MUG

APHA = American Public Health Association

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

BCIG = 5-bromo-4-cloro-indoxil- β -D-glucuronídeo

BMA-MUG = ágar tamponado com MUG

BVB = caldo verde brilhante com bile a 2%

BVB-MUG = caldo verde brilhante com bile a 2%, triptofano e MUG

Colab. = colaboradores

EAM = ágar eosina e azul de metileno segundo Levine

EC-MUG = caldo EC com MUG

EPM = meio Escola Paulista de Medicina

GUA = β -glucuronidase

HGMF = membrana filtrante com "grid" hidrofóbico

IBDG = indoxil- β -D-glucuronídeo

LMG = ágar lactose monensim glucuronato

LST = caldo lauril sulfato de sódio triptose

LST-MUG = caldo lauril sulfato de sódio triptose com triptofano e MUG

m-ENDO = meio m-ENDO

m-ENDO-MUG = meio m-ENDO com MUG

m-TEC = meio m-TEC

MacConkey-MUG = caldo MacConkey com MUG

MILi = meio motilidade indol lisina

MUG = 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo

NMP = número mais provável

ONPG = o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo

PA = meio de presença ou ausência

PCA = ágar para contagem padrão em placas

PCA-MUG = ágar para contagem padrão em placas com triptofano e MUG

PGUA = ácido nitrofenil- β -D-glucuronídeo

TSA = ágar tripticase - soja

UFC = unidades formadoras de colônia

UV = ultra violeta

VM = teste de vermelho de metila

VP = teste de Voges-Proskauer

VRBA = ágar vermelho violeta bile

1 - INTRODUÇÃO

A avaliação das condições higiênico-sanitárias de alimentos, águas e ambientes é realizada através da pesquisa e quantificação de microrganismos ou grupo de microrganismos denominados indicadores. Dentre estes, destacam-se os coliformes, os coliformes fecais e *Escherichia coli* que são indicadores de contaminação fecal por serem originários do trato intestinal de animais (HARTMAN e colab., 1985; LEITÃO, 1988).

O grupo dos coliformes fecais, no qual predomina a *Escherichia coli*, é definido como coliformes que têm a habilidade de crescer e produzir gás a partir da lactose, quando incubados a 44,5°C (MEHLMAN, 1984; HARTMAN e colab., 1985; LEITÃO, 1988). No entanto, existem controvérsias em relação a esta definição (PTAK e colab., 1973; DUFOUR, 1975; CAPLENAS e KANAREK, 1984; EDBERG e colab., 1986; RIPPEY e colab., 1987; DAMAGLOU e colab., 1988; BAGLEY e SEIDER, 1977). A *Escherichia coli* é frequentemente preferida como indicador de contaminação fecal recente, por ter como habitat preferencial ou, praticamente exclusivo, o trato intestinal de animais, geralmente não resistindo por longos períodos em outros ambientes (RIPPEY e colab., 1987; RICE e colab., 1990).

A pesquisa de *Escherichia coli* pela técnica clássica do número mais provável (NMP), que é o método de referência para outros métodos alternativos, está baseada na capacidade deste microrganismo fermentar a lactose e produzir gás. Neste método empregam-se tubos múltiplos (3 ou 5 tubos para cada diluição do alimento em teste) e vários meios de cultura, combinados com temperaturas e tempos diferentes requerendo de 6 a 10 dias para sua completa identificação bioquímica (APHA, 1978; AOAC, 1990; MEHLMAN, 1984).

Apesar do método dos tubos múltiplos (NMP) ser amplamente usado, HARTMAN e colab. (1985) relacionaram alguns problemas referentes a essa técnica: pode ser necessário um período de 6 a 10 dias para a quantificação de *Escherichia coli*; bactérias não coliformes, quando em grandes quantidades, interferem no crescimento dos coliformes; cepas de *Escherichia coli* não fermentadoras de lactose não são detectadas; cepas de *Escherichia coli* podem formar colônias atípicas; algumas bactérias não coliformes podem formar colônias típicas e, ainda, a dificuldade na recuperação de células injuriadas.

Para contornar estes inconvenientes, muitos pesquisadores têm estudado novos métodos para a detecção de *Escherichia coli* em alimentos e água, com o objetivo principal de contornar esses problemas, principalmente no que diz respeito à aceleração na obtenção de resultados.

Dentre as técnicas para a pesquisa de coliformes descritas na literatura e que fornecem resultados com maior rapidez temos:

- * Método de NMP com meio A-1, recomendado para a pesquisa de coliformes fecais em água (ANDREWS e colab., 1979; ANDREWS e colab., 1981; AOAC, 1990).

- * Membrana filtrante, recomendada para a pesquisa de coliformes em água, alimentos líquidos, alimentos em pó e derivados do leite (ENTIS, 1983; BRANCHER, 1992).

- * Membrana hidrofóbica (HGFM), recomendada para alimentos de um modo geral (ENTIS, 1983; AOAC, 1990).

- * Plaqueamento em gel de pectina, recomendada para produtos lácteos (AOAC, 1990).

- * Plaqueamento em filme seco reidratável-Petrifilm, recomendada para alimentos de um modo geral (NELSON e colab., 1984; GINN e PAKCRD, 1986;

RESTAINO e LYON, 1987; CURIALE e colab. 1989; ABGRALL e CLERET, 1990; AOAC, 1990; MATNER e colab., 1990).

* Técnicas fluorogênicas para a detecção de *Escherichia coli* (FENG e HARTMAN, 1982; ALVAREZ, 1984; ANDREWS e colab., 1987; PETERSON e colab., 1987; POELMA e colab., 1987; MOBERG e colab., 1988; WEISS e HUMBER, 1988; ENTIS, 1989; AOAC, 1990; RICE e colab., 1990).

As técnicas fluorogênicas baseiam-se na atividade da enzima β -glucuronidase produzida por *Escherichia coli*, que hidrolisa β -glucuronídeos, tendo como alvo a posição β de substratos como:

* 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronídeo (BCIG), com um produto de degradação de cor azul (FRAMPTON e colab., 1988; WATKINS e colab., 1988; MATNER e colab., 1990; CURIALE e colab., 1991)

* Indoxil- β -D-glucuronídeo (IBDG), com produto de degradação de cor azul (LEY e colab., 1988; SHARPE e colab., 1989).

* Ácido 4-nitrofenil- β -D-glucuronídeo (PGUA), com um produto de degradação de cor amarela (KILIAN e BULOW, 1976; LE MINOR, 1979; EDBERG e KONTRICK, 1986; CASELLAS e ORDUNA, 1988).

* 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) com um produto de degradação fluorescente (MEAD e colab., 1955; FENG e HARTMAN, 1982; ALVAREZ, 1984; ANDREWS e colab., 1987; PETERSON e colab., 1987; POELMA e colab., 1987; MOBERG e colab., 1988; WEISS e HUMBER, 1988; ENTIS, 1989; AOAC, 1990; RICE e colab., 1990).

Entre estes substratos, o mais empregado em testes microbiológicos é o 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) que, ao ser hidrolisado, produz a 4-metilumbeliferona, a qual tem a propriedade de ser fluorescente quando exposta a luz ultra violeta (UV) com comprimento de onda longo (366nm) demonstrando,

assim, a presença de *Escherichia coli* pela emissão de luz fluorescente azul. O uso do MUG é recomendado na concentração de 50 a 100 µg/ml e não é tóxico para a *Escherichia coli* (FENG e HARTMAN, 1982; MOBERG, 1985; ANDREWS e colab., 1987; POELMA e colab., 1987).

A β-glucuronidase produzida por *Escherichia coli* é uma enzima induzível (FENG e colab., 1991), com o valor de pH ótimo para sua produção de 7,3 e diminui em 27% e 38%, quando o valor de pH é modificado para 6,5 e 8,0, respectivamente (BUEHLER e colab., 1951). Assim como a produção, também a atividade da β-glucuronidase é dependente do pH, como demonstraram KILIAN e BULOW (1976), que observaram que o valor pH ótimo para a atividade da enzima é de 8,5, e quando este é reduzido para 7,0, a atividade da enzima diminui em 50%.

A utilização do MUG para a pesquisa de *Escherichia coli* em alimentos foi sugerida por FENG e HARTMAN (1982). Esses autores incorporaram o MUG aos meios de cultura tradicionais na pesquisa de coliformes, obtendo-se a resposta fluorogênica quando a *Escherichia coli* estava presente.

Em caldo lactosado lauril sulfato de sódio triptose com MUG (LST-MUG), uma célula de *Escherichia coli* por ml da amostra é capaz de desenvolver a fluorescência num período de 12 a 20h, que é quando atinge o número de 10^7 a 10^8 células por ml. Quando o inóculo é de 10^4 células por ml a fluorescência é observada num período de 4 a 6h (FENG e HARTMAN, 1982; MOBERG, 1985), porém, a produção de gás só é observada num período superior a 9h (FENG e HARTMAN, 1982). Além disto, o MUG não afeta a *Escherichia coli* quanto a produção de gás (MOBERG, 1985) e não exerce efeito inibidor sobre os outros coliformes (MOBERG, 1985; RIPPEY e colab., 1987).

O método fluorogênico que emprega MUG é bastante utilizado devido a sua alta especificidade, principalmente quando meios de cultura seletivos são utilizados. Na Tabela 01 encontra-se uma relação dos estudos publicados por vários autores, envolvendo a atividade β -glucuronidásica de cepas de *Escherichia coli* provenientes de diferentes origens.

Alguns dados indicam que a produção de β -glucuronidase por cepas de *Escherichia coli* depende da natureza do material do qual o microrganismo é isolado. Os estudos de CHANG e colab. (1989) demonstraram, em amostras clínicas, uma proporção de cepas de *Escherichia coli* MUG negativas maior do que a encontrada em estudos com alimentos, águas, entre outros.

A β -glucuronidase também pode ser produzida por outras espécies bacterianas: 6 a 30% das cepas de *Salmonella* spp, (LE MINOR, 1979; FENG e HARTMAN, 1982; TRAPETA e colab., 1984; EDBERG e colab., 1986; WEISS e HUMBER, 1988; SHARPE e colab., 1989), 30 a 100% das cepas de *Shigella* spp (KILIAN e BULOW, 1976; FENG e HARTMAN, 1982; TRAPETA e colab., 1984; WEISS e HUMBER, 1988; SHARPE e colab., 1989).

Na literatura são citados casos isolados de outras bactérias produtoras de β -glucuronidase e que não afetam significativamente os propósitos do teste fluorogênico (DAMARE e colab., 1985; MOBERG, 1985; EDBERG e colab., 1986; KASPAR e colab., 1987; WATKINS e colab., 1988; CHANG e colab., 1989; SHARPE e colab., 1989; GAUTHIER e colab., 1991; JACKSON e colab., 1992)

RICE e colab. (1991), ao avaliarem 67 cepas do gênero *Escherichia*, que não *Escherichia coli*, não encontraram nenhuma cepa positiva para a

Tabela 01: β -glucuronidase (GUA) produzida por cepas de *Escherichia coli* de diferentes origens.

<i>Escherichia coli</i>			SUBST. ⁴	REFERÊNCIA
ORIGEM ¹	CEPAS ² (Nº)	GUA+ ³ (%)		
Coleção	113	97,0	PGUA	KILIAN e BULOW, 1976
Coleção	110	96,0	MUG	FENG e HARTMAN, 1982
Coleção	55	93,0	MUG	KASPAR e colab., 1987
Clínica	75	96,0	MUG	TRAPETA e colab., 1984
Clínica	169	88,7	MUG	EDBERG e KONTRICK, 1986
Clínica	–	66,0	MUG	CHANG e colab., 1989
Urina	383	95,2	PGUA	CASELLAS e ORDUNA, 1988
Urina	466	70,8	MUG	DÖLLER e colab., 1990
Fezes	620	99,5	MUG	RICE e colab., 1990
Suíno	482	91-93	MUG	JACKSON e colab., 1992
Água	63	97,0	IBDG	LEY e colab., 1988
Alimento	293	95,0	MUG	RIPPEY e colab., 1987
Alimento	126	99,2	BCIG	WAPKINS e colab., 1988

¹ Origem das cepas estudadas.

² Número de cepas testadas.

³ Porcentagem de cepas produtoras de β -glucuronidase.

⁴ Substrato utilizado no teste.

produção da β -glucuronidase. Já as cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 não produzem esta enzima (FENG e HARTMAN, 1982; DOYLE e SCHOENI, 1984; RATNAN e colab., 1988; FENG e colab., 1991).

Baseados na especificidade da β -glucuronidase, muitos estudos têm sido conduzidos para padronizar metodologias rápidas na detecção de *Escherichia coli* em água de consumo, em águas marinhas, em águas residuais, em sedimentos e em produtos alimentícios.

Para água, muitos trabalhos foram realizados. Pela incorporação de IBDG no meio m-TEC e usando a técnica de membrana filtrante, LEY e colab. (1988) observaram que 97% das cepas de *Escherichia coli* isoladas apresentaram respostas características, ou seja, colônias azuis devido a liberação de um produto cromogênico a partir do IBDG, sendo portanto facilmente diferenciadas da flora acompanhante.

GAUTHIER e colab. (1991) também utilizaram a técnica de membrana filtrante para a pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de água e sedimento marinho, com diferentes meios de cultura incubados a 44,5°C, por 24h. O teste da β -glucuronidase foi realizado em AN-MUG, transferindo-se a membrana para este meio e incubando-se a 36°C, por 3 a 4h. Com este estudo os autores observaram que 95,5% das colônias MUG positivas foram identificadas com *Escherichia coli*. A sensibilidade e especificidade foram maiores que as apresentadas pela técnica de membrana filtrante tradicional.

Usando a resposta fluorogênica, por adição de MUG ao meio PA, LEE e HARTMAN (1989) não encontraram diferenças significativas na pesquisa de *Escherichia coli* para amostras de água de rio, lago, poço e de efluentes, quando comparadas com as técnicas clássicas.

Recentemente, foi desenvolvido o sistema Colilert que permite a detecção simultânea de coliformes e *Escherichia coli*. A mudança na coloração do meio para amarelo indica a ação dos coliformes sobre o ONPG e a resposta

fluorogênica indica a ação da *Escherichia coli* sobre o MUG. Estes dois compostos (ONPG e MUG) são substratos essenciais e indicadores ao mesmo tempo (EDBERG e colab., 1988). Com este sistema, EDBERG e colab. (1988); COVERT e colab. (1989); EDBERG e colab. (1989); EDBERG e colab. (1990) e EDBERG e colab. (1991) obtiveram excelentes resultados na pesquisa de *Escherichia coli* em amostras de água. Já CLARK e colab. (1991), ao contrário dos outros autores, observaram que este sistema é ineficiente para a pesquisa de *Escherichia coli* em água tratada, devido ao grande número de respostas falso negativas.

Utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade, com BCIG incorporado ao meio de cultura, WATKINS e colab. (1988) mostraram que este método apresenta especificidade alta e permite a diferenciação da *Escherichia coli* a partir de amostras de água residual e "shellfish". Neste estudo a taxa de respostas falso positivas foi de 5,0% e de falso negativas foi de 1,0%.

Em relação a estudos envolvendo produtos alimentícios, os dados encontrados na literatura sugerem que o emprego de testes baseados na ação da β -glucuronidase para pesquisa de *Escherichia coli* é bastante promissor.

ROBINSON (1984) analisou, através do teste fluorogênico, 270 amostras de produtos alimentícios, entre eles, alimentos em pó e ingredientes crus. Após o enriquecimento da amostra em caldo nutriente e com subcultivos em LST-MUG, o autor obteve concordância com o método de referência em 95,0% dos casos. Não obteve respostas falso negativas e a taxa de respostas falso positivas foi de 4,8%, sendo a maioria em amostras de proteína de soja.

ALVAREZ (1984), testando o método fluorogênico em alimentos marinhos (30 amostras), incorporou MUG ao caldo lactosado, ao meio VRBA e

no meio m-Endo e os resultados mostraram especificidade de 96,5, 92,0 e 90,0%, respectivamente. Em termos quantitativos, os métodos foram equivalentes e as respostas falso positivas foram de 3,5% para o caldo lactosado-MUG, de 8,0% para o meio VRBA-MUG e de 10,0% para o meio m-Endo-MUG.

MOBERG (1985) pesquisou *Escherichia coli* em 1.297 amostras de produtos alimentícios (produtos prontos e ingredientes) empregando LST-MUG e concluiu que o método foi equivalente ao clássico, com uma taxa de 1,4% de respostas falso positivas, devido a *Staphylococcus spp* e não obteve respostas falso negativas.

KOBURGER e MILLER, 1985, pesquisaram *Escherichia coli* em 27 amostras de ostras. Devido a presença de β -glucuronidase endógena nas ostras, a leitura da fluorescência foi feita no segundo caldo de enriquecimento (EC-MUG). Com isto, os autores obtiveram 1,0% de resultados falso positivos, sem resultados falso negativos. Resultados semelhantes foram obtidos por RIPPEY e colab.(1987), quando avaliaram duas técnicas fluorogênicas para amostras de crustáceos, uma usando LST-MUG e outra usando enriquecimento em caldo LST com confirmação em caldo EC-MUG a 44,5°C. Neste estudo, os autores demonstraram que 0,1g da amostra é capaz de gerar fluorescência por ação da β -glucuronidase endógena, sendo necessária a confirmação em caldo EC-MUG. Obtiveram a confirmação de 91,0% das respostas fluorescentes e uma taxa de 11% de resultados falso negativos.

Baseados no mesmo raciocínio, BALEBONA e colab. (1990), pesquisando *Escherichia coli* em "shellfish", obtiveram especificidade de 100% na resposta de fluorescência. Neste estudo foi utilizado um enriquecimento em caldo MacConkey a 36°C, por 48h, com confirmação em caldo MacConkey-MUG

a 44,5°C, por 24h. Também foram obtidos bons resultados para amostras de água e de sedimento marinho. No geral, a especificidade foi de 94,0% e teve sensibilidade maior do que a resposta de produção de gás.

Utilizando a metodologia citada anteriormente, MOTES e PEELER (1991), obtiveram resultados estatisticamente semelhantes aos da técnica clássica com confirmação de 77,0 e 95,0% para respostas fluorescentes em amostras de ostras e de água do mar, respectivamente. Estas taxas de confirmação foram maiores do que as taxas obtidas pela técnica convencional.

ANDREWS e colab. (1987) testaram o método fluorogênico em amostras de semente de girassol, nozes e carne de caranguejo artificialmente contaminadas. Os métodos utilizados foram: caldo LST-MUG e EC-MUG subcultivado a partir de LST-24h e LST-48h, os quais foram comparados ao método clássico dos tubos múltiplos (AOAC). Os resultados mostraram equivalência entre as quatro técnicas para as amostras de semente de girassol. Para as amostras de nozes, o método que empregou o LST-MUG apresentou resultados inferiores àqueles obtidos pelos outros três métodos, os quais foram equivalentes entre si. Para as amostras de carne de caranguejo, os métodos da AOAC e LST-MUG foram equivalentes. Os métodos que empregaram o EC-MUG, subcultivados a partir de LST 24 e 48h, apresentaram resultados equivalentes aos obtidos pelo método LST-MUG e maiores que os resultados obtidos pelo método da AOAC. Porém, o método fluorogênico com LST-MUG apresentou altas proporções de respostas falso positivas para as amostras de nozes e carne de caranguejo, além de algumas respostas falso negativas para as amostras de carne de caranguejo e de sementes de girassol.

PETERSON e colab. (1987), utilizando LST-MUG para amostras de torta de frango, camarão congelado e nozes Pecan, artificialmente contaminadas com

três níveis de *Escherichia coli*, observaram que o método fluorogênico apresentou resultados maiores em 3 e equivalentes em 6 tipos de amostras, das 9 combinações testadas.

Em produtos cárneos (lingüiça crua de porco, carne moída bovina e carne moída de peru), os métodos fluorogênico (LST-MUG) e clássico foram comparados e não se observou diferenças significativas, porém, houve grande quantidade de respostas falso positivas (POELMA e colab., 1987).

Num estudo colaborativo, MOBERG e colab.(1988) avaliaram a metodologia fluorogênica, empregando LST-MUG, para alimentos congelados (molhos e "dairy topping") e refrigerados (hamburguer, lingüiça de porco e queijo), artificialmente contaminados e observaram que o método fluorogênico foi, no geral, melhor ou igual ao método clássico. Para as amostras não cárneas, 95,0% dos tubos com *Escherichia coli* foram MUG positivos e para as amostras cárneas, 85,0% do tubos com *Escherichia coli* foram MUG positivos.

Na pesquisa de *Escherichia coli* em broto de feijão por duas técnicas fluorogênicas, empregando o caldo MacConkey-MUG e caldo BVB-MUG, DAMOGLU e colab. (1988) obtiveram resultados sem respostas falso positivas ou negativas, eliminando assim o problema de respostas falso positivas devido a *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, frequentemente observadas no método tradicional.

Utilizando a técnica de HGMF, SHARPE e colab. (1989) avaliaram a eficiência do substrato IBDG em três meios de cultura. Empregando IBDG na concentração de 600-800 μ g/ml e incubação a 44,5°C, por 24h, apenas 1,0% das cepas não *Escherichia coli* foram β -glucuronidase positivas. 30% das cepas de *Escherichia coli* apresentaram resposta fraca.

ENTIS (1989) pesquisou *Escherichia coli* em alimentos, utilizando o teste da β -glucuronidase em conjunto com a técnica de HGMF. O método constituiu em observar a resposta fluorogênica no meio BMA-MUG, para onde a membrana filtrante era transferida após a incubação a 35°C, por 24h em meio LMG, que age como indutor da produção de β -glucuronidase. As colônias desenvolvidas no meio LMG foram identificadas como coliformes e a diferenciação de *Escherichia coli* foi feita pela detecção de fluorescência no meio BMA, após 2h a 35°C. Esta técnica, em relação a técnica clássica dos tubos múltiplos, apresentou resultados maiores para as amostras de ovos desidratados, queijo desidratado e pimenta preta moída, e resultados semelhantes para amostras de carne moída de ave e leite cru.

Objetivando otimizar a recuperação de células injuriadas, WEISS e HUMBER (1988) testaram a eficiência do método TSA/VRBA-MUG, que consiste num plaqueamento em profundidade em TSA-MUG, com manutenção em repouso por 1 a 2h, para então ser adicionado o VRBA-MUG. Desta forma, os autores obtiveram 95,8% de positividade para as colônias de *Escherichia coli*, sem respostas falso positivas. Já quando o MUG foi incorporado apenas no VRBA o método perdeu a eficiência. Este estudo foi realizado com cepas purificadas.

Com sistema Petrifilm-*E.coli*, no qual se observa a atividade da β -glucuronidase de cepas *Escherichia coli* sobre BCIG, MATNER e colab. (1990) demonstraram sua equivalência à técnica recomendada pela AOAC para amostras de queijos, vegetais e carne de ave.

Também usando o sistema Petrifilm-*E.coli*, CURIALE e colab. (1991) num estudo colaborativo, aprovaram este método para pesquisa de *Escherichia coli* em alimentos, que proporcionou sua adoção pela AOAC.

De acordo com o que foi exposto, as metodologias baseadas na atividade da β -glucuronidase, respeitando as peculiaridades, são recomendadas para uma grande variedade de alimentos, por apresentarem resultados equivalentes às técnicas tradicionais e por terem como principais vantagens a rapidez na obtenção de resultados e a eliminação de etapas complementares de confirmação na pesquisa de *Escherichia coli*.

Porém, em determinados alimentos, altas taxas de respostas falso positivas e negativas são observadas, requerendo estudos para avaliar a eficiência destas metodologias. No caso de ostras, por exemplo, que apresentam esta enzima nos seus tecidos, o número de respostas falso positivas pode ser bastante elevado (KOBBERGER e MILLER, 1985; RIPPEY e colab., 1987). Além disso, existe a suspeita de que as respostas falso negativas também dependem do tipo de alimento analisado (WEISS e HUMBER, 1988).

Em função dos dados apresentados, verifica-se que, apesar do grande número de trabalhos conduzidos para avaliar a eficiência da técnica fluorogênica na enumeração de *Escherichia coli* em água e alimentos, não há unanimidade com relação às vantagens e desvantagens dessa metodologia.

2. OBJETIVOS

Comparar o método fluorogênico que utiliza o 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronideo (MUG) como substrato da enzima β -glucuronidase produzida por cepas de *Escherichia coli* com o método clássico dos tubos múltiplos para enumeração de *Escherichia coli* em leite e derivados (queijo tipo Minas frescal e sorvete)

Observar a existência de diferenças nos resultados obtidos em 24h e 48h para a metodologia fluorogênica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Foram analisadas 120 amostras de alimentos, sendo 30 de leite cru, 30 de queijo tipo Minas frescal, 30 de leite pasteurizado tipo C e 30 de sorvete.

3.1.1. LEITE CRU

Foram analisadas 30 amostras de leite cru correspondendo à 15 amostras de leite cru destinado a produção de leite pasteurizado tipo B (leite cru B) e 15 amostras de leite cru destinado a produção de leite pasteurizado tipo C (leite cru C). As amostras foram fornecidas por um grande laticínio localizado na cidade de São Paulo - SP. A coleta foi realizada por um técnico do laticínio, sempre na madrugada do dia da análise. 500ml de leite eram coletados diretamente do caminhão tanque para um frasco estéril e mantidos sob refrigeração até o momento da análise.

3.1.2. QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL

As 30 amostras foram obtidas no comércio da cidade de São Paulo - SP, correspondendo à 16 marcas comerciais diferentes. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade e foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

3.1.3. LEITE PASTEURIZADO TIPO C

As 30 amostras foram obtidas no comércio da cidade de São Paulo - SP, correspondendo à 7 marcas comerciais diferentes. 26 amostras

apresentaram como data de validade o dia da análise e 4 o dia anterior à análise. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

3.1.4. SORVETE

As 30 amostras foram obtidas no comércio da cidade de São Paulo - SP, correspondendo à 9 marcas comerciais diferentes e com os sabores: chocolate, creme, morango, cereja, coco, ameixa, avelã, pistache, maracujá, uva, e tangerina. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

3.2. MATERIAIS

3.2.1. MEIOS DE CULTURA

- Ágar citrato, segundo Simmons
- Ágar eosina azul de metileno segundo Levine (EAM)
- Ágar nutriente (AN)
- Ágar para contagem padrão em placas (PCA)
- Ágar para contagem padrão em placas com triptofano e MUG (100 µg/ml) (PCA-MUG)
- Caldo EC (EC)
- Caldo lactosado lauril sulfato de sódio-triptose (LST)
- Caldo lactosado lauril sulfato de sódio-triptose com triptofano e MUG (100µg/ml) (LST-MUG)
- Caldo lactosado verde brilhante com bile a 2% (BVB)
- Caldo lactosado verde brilhante com bile a 2%, triptofano e MUG (100µg/ml) (BVB-MUG)
- Caldo púrpura de bromocresol com celobiose a 0,5%

- Caldo VM-VP
- Meio EPM (TOLEDO e colab., 1982b)
- Meio MILi (TOLEDO e colab., 1982a)
- Sistema API-20E (Analytab products)

Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Merck (os que continham MUG foram da linha Fluorocult-Merck). Os meios de cultura foram preparados segundo as orientações do fabricante.

3.2.2. SOLUÇÕES E REATIVOS (APHA, 1978)

- Reativo de Kovacs
- Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,02%
- Solução alcoólica de α -naftol 5%
- Solução de Butterfield
- Solução de citrato de sódio 2%
- Solução de NaOH 2N

3.3.MÉTODOS

3.3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS (APHA, 1978)

Alíquotas de 25g ou 25ml foram homogeneizadas com 225ml do diluente apropriado, empregando-se um homogeneizador, quando necessário. Após a homogeneização, foram preparadas as diluições decimais subsequentes, tomando-se 10ml da diluição anterior e 90ml do diluente.

Para as amostras de leite cru, leite pasteurizado e sorvete foi utilizada solução de Butterfield como diluente, e para as amostras de queijo foi utilizada solução de citrato de sódio 2%.

3.3.2. MÉTODO CLÁSSICO DOS TUBOS MÚLTIPLOS PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* (APHA, 1978) (Fig.01)

A partir das diluições decimais seriadas, inoculou-se, em triplicata, 1ml de cada diluição para tubos contendo caldo de enriquecimento primário e um tubo de Durham invertido. Para as amostras de leite, o enriquecimento primário foi realizado em caldo BVB e para as amostras de queijo e de sorvete em caldo LST. Os tubos foram incubados a 35°C, por 24 e 48h. A partir dos tubos que apresentaram turvação e formação de gás após este período, alíquotas foram transferidas, com auxílio de um bastão de madeira estéril (3mm de diâmetro), para tubos contendo caldo EC e um tubo de Durham invertido, os quais foram incubados a 44,5°C, por 24h, em banho maria. Dos tubos que apresentaram turvação e formação de gás, alíquotas foram inoculadas, por esgotamento, com auxílio de um alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar EAM, as quais foram incubadas a 35°C, por 24h. Após este período, foram selecionadas e isoladas, em AN, 3 colônias suspeitas de serem *Escherichia coli*, que foram incubadas a 35°C, por 24h. Em seguida, efetuou-se a identificação bioquímica dessas colônias, conforme descrito no item 3.3.4.

A partir dos tubos de caldo EC, nos quais foi observada a presença de *Escherichia coli*, calculou-se o número mais provável (NMP) de *Escherichia coli* por g ou ml do alimento, utilizando a tabela de Hoskins.

Nas análises de leite cru utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-5} , nas análises de queijo tipo Minas frescal utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-8} e nas análises de sorvete utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-3} . Na análise de leite pasteurizado foram inoculados 10ml da amostra (em 10ml do caldo BVB em concentração dupla), 1ml da amostra e ainda 1ml das diluições 10^{-1} a 10^{-3} .

3.3.3. MÉTODO FLUOROGÊNICO PARA ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli* (FENG e HARTMAN, 1982) (fig. 01)

A partir das diluições decimais seriadas, inoculou-se, em triplicata, 1ml de cada diluição para tubos contendo caldo de enriquecimento primário com MUG e um tubo de Durham invertido. Para as amostras de leite, o enriquecimento primário foi realizado em caldo BVB-MUG e para as amostras de queijo e de sorvete em caldo LST-MUG. Os tubos foram incubados a 35°C, por 24 e 48h. Os tubos que apresentaram turvação e formação de gás foram submetidos ao teste de produção de indol e de resposta fluorogênica. Para a realização da leitura da resposta fluorogênica, de cada tubo que apresentou turvação e/ou formação de gás transferiu-se para um tubo vazio aproximadamente 3ml do caldo. A fluorescência azul foi observada pela exposição direta destes tubos à luz UV com comprimento de onda longo (366nm), utilizando-se uma câmara apropriada. Quando a resposta era fraca ou negativa, foram acrescentadas de 2 a 5 gotas de solução de NaOH 2N, para elevar o pH do caldo e facilitar a leitura. Este procedimento foi adotado para as leituras de 24 e 48h. Após a leitura da fluorescência, efetuou-se o teste de produção de indol. A formação de um halo vermelho na superfície do caldo após a adição de 0,2ml de reativo de Kovacs era considerada resposta positiva. A partir dos tubos que apresentaram turvação e/ou produção de gás e/ou reação de indol positiva e/ou fluorescência, alíquotas foram transferidas, com auxílio de um bastão de madeira estéril (3mm de diâmetro), para tubos contendo caldo EC e um tubo de Durham invertido, os quais foram incubados a 44,5°C, por 24h em banho maria. Dos tubos que apresentaram turvação e formação de gás, alíquotas foram inoculadas, por esgotamento, com auxílio de um alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar EAM, as quais foram incubadas a 35°C, por 24h. Após este período, foram selecionadas e isoladas, em PCA-MUG, 3 colônias

suspeitas de serem *Escherichia coli*, que foram incubadas a 35°C, por 24h. Em seguida, efetuou-se a identificação bioquímica dessas colônias, conforme descrito no item 3.3.4.

Para os tubos com caldo LST-MUG ou BVB-MUG com respostas positivas para MUG (fluorescência) e com respostas negativas em algumas das etapas subsequentes da confirmação de *Escherichia coli*, ou seja, resposta negativa em EC (ausência de turvação ou gás) ou EAM (ausência de colônias suspeitas) ou em PCA-MUG (ausência de colônias MUG positivas), alíquotas do caldo destes tubos foram inoculadas, por esgotamento, em duas placas, uma contendo EAM e outra contendo PCA-MUG, as quais foram inoculadas a 35°C, por 24h. Após este período, foram selecionadas e isoladas três colônias suspeitas de serem *Escherichia coli*, para posterior identificação bioquímica (item 3.3.4).

A partir dos tubos com respostas positivas para MUG (fluorescência), calculou-se o número mais provável (NMP) de *Escherichia coli* por g ou ml da amostra, utilizando-se a tabela de Hoskins.

Nas análises de leite cru utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-5} , nas análises de queijo tipo Minas frescal utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-8} e nas análises de sorvete utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-3} . Na análise de leite pasteurizado foram inoculados 10ml da amostra (em 10ml do caldo BVB em concentração dupla), 1ml da amostra e ainda 1ml das diluições 10^{-1} a 10^{-3} .

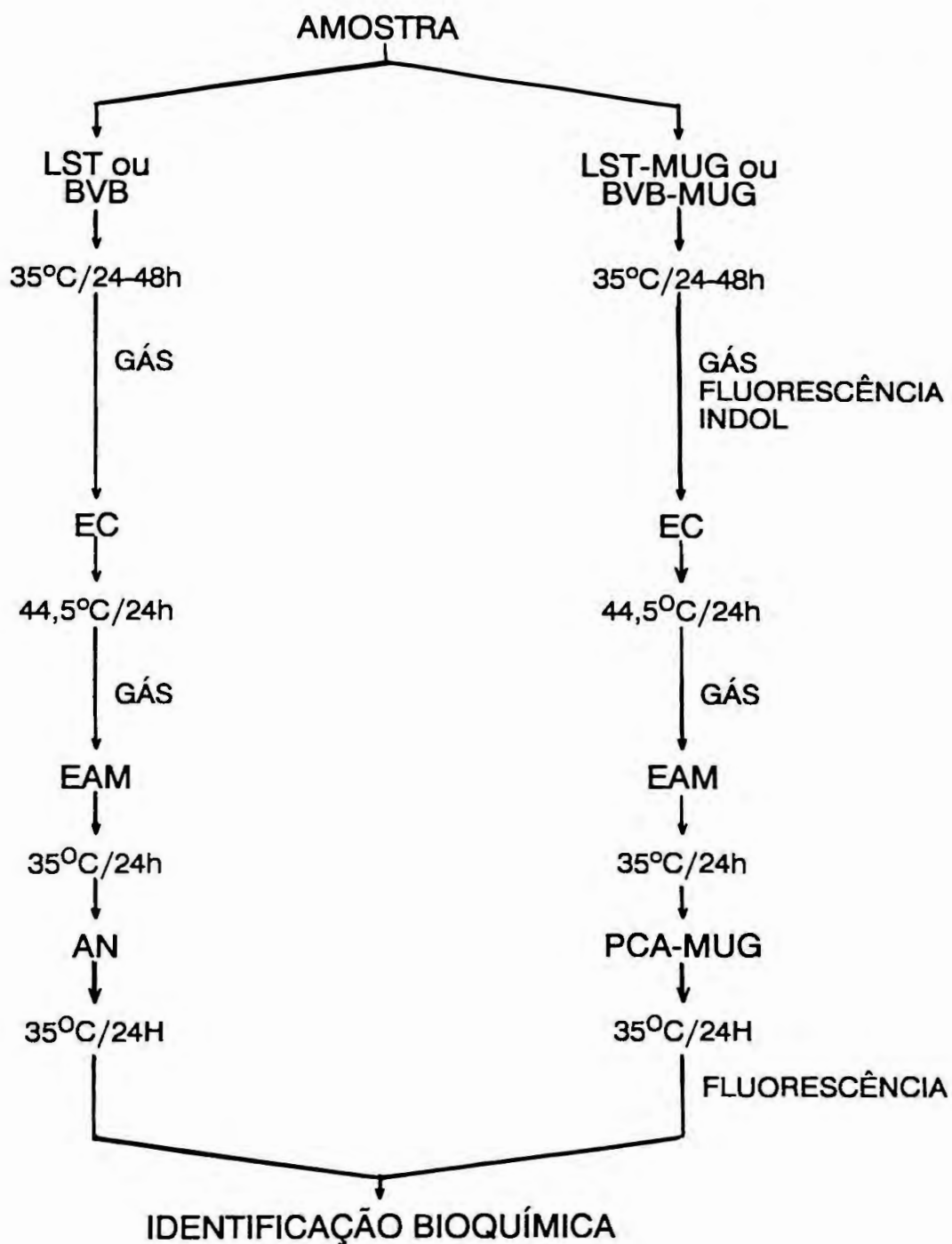


Figura 01: Representação esquemática das técnicas clássica e fluorogênica para detecção de *Escherichia coli* em leite e derivados.

3.3.4. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA (EDWARDS e EWING, 1986)

A identificação foi realizada através das seguintes provas bioquímicas:

- Produção de indol (meio MILi)
- Reação de VM
- Reação de VP
- Utilização de citrato de sódio
- Fermentação da glicose com produção de gás (meio EPM)
- Fermentação da celobiose em caldo púrpura de bromocresol.
- Produção de urease (meio EPM)
- Produção de H₂S (meio EPM)
- Produção de L-triptofano desaminase (meio EPM)
- Produção de L-lisina descarboxilase (meio MILi)
- Motilidade (Meio MILi)

No caso de dúvidas na identificação, utilizou-se o sistema API-20E, com leitura em 24h.

3.3.5 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS DE BACTÉRIAS MESÓFILAS VIÁVEIS AERÓBICAS OU FACULTATIVAS (APHA, 1978)

1ml de cada diluição decimal foi transferida, em duplicata, para uma placa de Petri estéril e vazia, e adicionou-se aproximadamente 15 ml de ágar PCA fundido e a $\pm 45^{\circ}\text{C}$. Após homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35°C , por 48h. Após este período, foram contadas as colônias das placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias. Os números obtidos foram expressos como unidades formadoras de colônia (UFC) por g ou ml.

As diluições utilizadas foram: 10^{-3} a 10^{-5} para as amostras de leite

cru, 10^{-2} a 10^{-3} para as amostras de leite pasteurizado tipo C, 10^{-5} a 10^{-8} para as amostras de queijo tipo Minas frescal e 10^{-1} a 10^{-3} para as amostras de sorvete.

3.3.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para avaliação dos resultados obtidos foi utilizada a análise de variância para dados repetidos através do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas (WINER, 1971). Foram comparados os resultados obtidos pelo método clássico dos tubos múltiplos e os resultados obtidos pelo método fluorogênico com leitura de 24h e com leitura de 48h.

Todos os resultados de enumeração de *Escherichia coli* por g ou ml foram transformados em log na base 10.

Para efeito de interpretação e discussão dos resultados, foi utilizada a simbologia apresentada na Tabela 02, assim como foram consideradas as definições abaixo relacionadas.

Tabela 02: Símbolos utilizados para a identificação dos tubos com resultados especiais observados no método fluorogênico.

Leitura nos tubos				Recuperação de <i>Escherichia coli</i>		
Turv.	Gás	Indol	Mug	Presente		Ausente
				Mug+	Mug-	
+	+	+	+	A	B	C
+	+	-	+	D	E	F
+	+	+	-	G	H	-
+	+	-	-	I	J	-

ESPECIFICIDADE para a resposta fluorogênica: total de tubos com resposta MUG positiva e com *Escherichia coli* confirmada (A+B+D+E), em relação ao total de tubos com resposta MUG positiva (A+B+C+D+E+F).

Resultado FALSO POSITIVO para *Escherichia coli* para a resposta MUG positiva na técnica fluorogênica: total de tubos com resposta MUG positiva, porém, sem *Escherichia coli* (C+F), em relação ao total de tubos com resposta MUG positiva (A+B+C+D+E+F).

Resultado FALSO NEGATIVO para *Escherichia coli* para a resposta MUG negativa na técnica fluorogênica: total de tubos com resposta MUG negativa porém com *Escherichia coli* (G+H+I+J), em relação ao total de tubos com *Escherichia coli* (A+B+D+E+G+H+I+J).

ESPECIFICIDADE da resposta fluorogênica e indol: total de tubos com resposta MUG positiva e indol positiva e com *Escherichia coli* confirmada (A+B), em relação ao total de tubos com resposta MUG positiva e indol positiva (A+B+C).

Resultado FALSO POSITIVO para *Escherichia coli* para a resposta MUG positiva e indol positiva na técnica fluorogênica: total de tubos com resposta MUG positiva, porém, sem *Escherichia coli* (C), em relação ao total de tubos com resposta MUG positiva e Indol positiva (A+B+C).

Resultado FALSO NEGATIVO para *Escherichia coli* para a resposta MUG e Indol na técnica fluorogênica: total de tubos com resposta diferente de MUG positiva e Indol positiva, porém com *Escherichia coli* (D+E+G+H+I+J), em relação ao total de tubos com *Escherichia coli* (A+B+D+E+G+H+I+J).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 03, 04, 05, 06 estão apresentados os resultados das contagens de *Escherichia coli* pelas técnicas clássica e fluorogênica com leitura de 24h e 48h, das 120 amostras de alimentos analisados. A tabela 03 refere-se às amostras de leite cru, a tabela 04 às amostras de queijo tipo Minas frescal, a tabela 05 às amostras de leite pasteurizado tipo C e a tabela 06 às amostras de sorvete.

A tabela 07 apresenta os resultados da análise de variância (teste de Newman-Keuls) aplicada aos resultados apresentados nas tabelas 03, 04 e 05. A tabela 08 apresenta a interpretação dos resultados da análise de variância contidos na tabela 07.

No que diz respeito ao leite cru, verifica-se que a análise de variância indicou que, para $\alpha=1\%$, os métodos clássico e fluorogênico com leitura de 48h foram equivalentes. A resposta fluorogênica de 24h foi menor que a resposta obtida pelo método clássico. No entanto, para $\alpha=5\%$ e/ou $\alpha=10\%$, apenas as respostas fluorogênicas de 24 e 48h foram equivalentes.

Em função desses dados, os resultados referentes as amostras de leite cru foram reavaliados, considerando-se o tipo do leite cru. Assim, para leite cru destinado à produção de leite pasteurizado tipo B (aqui chamado de leite cru B), para $\alpha=1\%$, 5%, ou 10%, a metodologia clássica apresentou-se superior aos métodos fluorogênicos. As respostas fluorogênicas de 24h foram equivalentes às obtidas em 48h. No entanto, para o leite cru destinado a produção de leite pasteurizado tipo C (aqui chamado de leite cru C), as três metodologias foram equivalentes, independente do valor do α .

Essa discrepância nos resultados para os dois tipos de leite cru

pode ser explicada pelo fato de que no leite cru B houve um expressivo número (21,6%) de resultados falso negativos ou seja, tubos sem fluorescência, mas positivos para *Escherichia coli* (tabela 11). Parte desses resultados falso negativos foram devido à presença de cepas de *Escherichia coli* MUG negativa (13,5%) e parte à impossibilidade de desenvolvimento da fluorescência, apesar da presença de cepas *Escherichia coli* MUG positiva (8,1%). É importante ressaltar que resultados falso negativos devido à presença de cepas de *Escherichia coli* MUG negativas foram predominantemente observadas em apenas três amostras de leite cru B (tabela 03, amostras 10, 12 e 15), provenientes de somente dois locais de produção. Se essas amostras de leite cru B forem excluídas da análise de variância, os resultados mudam bastante: as contagens de *Escherichia coli* obtidas pela metodologia clássica e pela metodologia fluorogênica com leituras de 24h e 48h foram equivalentes quando $\alpha=1\%$. Entretanto, para $\alpha=5\%$ e/ou 10% , apenas as duas respostas fluorogênicas foram equivalentes. Assim, refazendo a análise estatística para leite cru, excluindo as amostras de número 10, 12 e 15, o teste demonstra que o método clássico é equivalente ao fluorogênico com leitura em 48h, com $\alpha=1; 5$ ou 10% , assim como, são equivalentes as respostas fluorogênicas de 24 e 48h. Já quando se compara o método clássico e o fluorogênico com respostas em 24h, há equivalência com $\alpha=1\%$, porém quando com $\alpha=5$ ou 10% o método clássico apresenta resultados superiores (tabela 07 e 08).

Quanto aos tubos sem fluorescência nos quais foi detectada a presença de *Escherichia coli* MUG positiva (8,1%), algumas considerações são importantes. Segundo ENTIS (1989), FARBER, (1986), JACSON e colab. (1992) e EDBERG e colab. (1991), devido à rápida acidificação do meio de cultura pela fermentação da lactose por ação da microbiota acompanhante, pode ocorrer interferência na produção e também na ação da enzima β -glucuronidase. Alguns

resultados interessantes à esse respeito merecem discussão. Nos experimentos realizados por FENG e HARTMAN (1982), foi comprovado que *Proteus vulvaris* não afeta a resposta fluorogênica de *Escherichia coli*, quando na proporção de $10^4:1$. Já GLAESER e HANEST (1986), avaliando o método fluorogênico em amostras de queijos macios, demonstraram que *Hafnia* spp não afetava a resposta fluorogênica na proporção de 10^7 células para 1 de *Escherichia coli*. Porém, *Enterobacter aerogenes*, na proporção de 10^4 células para 1 de *Escherichia coli*, algumas vezes poderia causar respostas falso negativas.

A hipótese de que a resposta fluorogênica pode ser afetada pela microbiota acompanhante é reforçada por outras observações verificadas durante a realização desse trabalho. Em alguns tubos a fluorescência foi observada somente após 5 dias. Em segundo lugar, por ser o leite cru B um produto com menor quantidade de *Escherichia coli* por ml, proporcionalmente, há uma competição com um número maior de bactérias acompanhantes, quando comparado com o leite cru C. Estas observações apresentaram-se em menor grau nas amostras de leite cru C, o que reforça as hipóteses acima descritas.

ENTIS (1989), avaliando a técnica de membrana hidrofóbica associada ao MUG para alimentos obtiveram confirmação de 97,0% das colônias MUG positivas obtidas a partir de amostras de leite cru e observaram que a técnica HGMF-MUG foi equivalente à dos tubos múltiplos (AOAC), demonstrando que a resposta fluorogênica pode ser aplicada para este tipo de produto.

No caso dos resultados de *Escherichia coli* para as amostras de queijo tipo Minas frescal (tabela 04), a análise estatística revelou que os métodos clássico e fluorogênico com leitura em 48h foram equivalentes com $\alpha=1\%$, assim como, foram equivalentes as duas respostas fluorogênicas, em 24 e 48h. Entretanto, quando se compara os resultados da metodologia clássica com os

resultados da metodologia fluorogênica com leitura em 24h, observa-se que a primeira apresenta resultados estatisticamente maiores. Quando a comparação é feita utilizando-se $\alpha=5$ ou 10%, observa-se que apenas as respostas fornecidas pelas metodologias clássica e fluorogênica com leitura em 48h são equivalentes (tabela 07 e 08).

O fato de, nas amostras de queijo tipo Minas frescal, apenas a resposta fluorogênica com leitura em 48h ter sido estatisticamente equivalente ao método clássico, pode ser devido à rápida fermentação que ocorre no meio, devido a microbiota acompanhante, dificultando a produção e/ou a expressão da β -glucuronidase, retardando a resposta fluorogênica. Esta hipótese é reforçada pela péssima qualidade microbiológica das amostras, como pode ser observado pelas contagens das bactérias totais mesófilas e de *Escherichia coli* (tabela 04).

No estudo colaborativo conduzido por MOBERG e colab. (1988) usando queijo e produtos de leite (congelados), o método fluorogênico (LST-MUG) foi equivalente ao método clássico para níveis de baixa e média contaminação e superior para o nível de contaminação alto. Essa constatação reforça a hipótese de que, para leite e derivados, o método fluorogênico é mais eficiente em produtos com níveis de contaminação mais elevados.

Tal como aconteceu nesse estudo, outros estudos demonstraram que existem diferenças entre as leituras de 24, 48, 72h. ENTIS (1989), sugeriram que essas diferenças se devem ao abaixamento rápido do pH, antes que a *Escherichia coli* hidrolise o MUG.

No caso de leite pasteurizado tipo C, verificou-se que, das 30 amostras analisadas, 5 foram positivas para *Escherichia coli*. *Escherichia coli* foi detectada pelas três técnicas, simultaneamente, em apenas 3 amostras (tabela

05). Neste caso, não foi aplicada a análise estatística, em função do pequeno número de amostras positivas. No entanto, pode-se dizer que os resultados para as amostras de número 05, 09 e 13 foram semelhantes (Tabela 05). Apenas nestes casos detectou-se fluorescência e *Escherichia coli* na amostra diluída, ou seja, em 0,1ml ou menos de leite.

Durante as análises de leite pasteurizado tipo C, obteve-se grande quantidade de respostas falso positivas pela metodologia fluorogênica. Dos 47 tubos MUG positivos, em 21 (44,7%) não se recuperou nenhuma bactéria capaz de hidrolisar o MUG. Todas as respostas falso positivas foram observadas nos tubos com caldo BVB-MUG inoculados com 1 ou 10 ml de leite, sugerindo a hipótese de que a enzima estava presente no leite. É possível que sejam enzimas produzidas por cepas de *Escherichia coli* presentes no leite cru, as quais foram destruídas no processo de pasteurização, porém, as enzimas resistiram a este processo. Nestas condições, existe a possibilidade de ocorrer a hidrólise do MUG à níveis perceptíveis, dando a impressão de que a *Escherichia coli* estava presente e viável no leite pasteurizado. Se comprovada esta hipótese, essa resposta pode ser utilizada como um indicador indireto das condições higiênico-sanitárias do leite, antes da pasteurização.

No caso de sorvete, *Escherichia coli* foi recuperada apenas de uma amostra (amostra nº 28) e pelo método clássico (tabela 06). Pelo método fluorogênico, observou-se apenas 9 tubos com fluorescência, porém, todos falso positivos e, da mesma forma que no caso de leite pasteurizado, não houve a recuperação de *Escherichia coli* ou de outras bactérias MUG positivas. Também nesse tipo de alimento surge a suspeita da presença de β -glucuronidase que, neste caso, resistiu aos processos de pasteurização e de congelamento.

Em virtude dos problemas de se pesquisar *Escherichia coli* em 1ml

de leite pasteurizado ou mais e em 0,1g de sorvete ou mais, através da técnica estudada, devido à possível interferência de β -glucuronidase presente nesses produtos, sugerimos o uso de caldo BVB-MUG para confirmar a presença de *Escherichia coli* e de coliformes nos tubos de caldo LST-MUG com respostas positivas para a produção de gás. Desta forma, obtém-se resposta em 48-72h, sem a necessidade do uso da incubação a 44,5°C e posterior confirmação. Este tipo de procedimento tem sido utilizado para produtos que apresentam a β -glucuronidase nos seus tecidos, como foi demonstrado em trabalhos com "shellfish" (RIPPEY e colab., 1987; MOTES e PELLER, 1991).

Em relação ao método fluorogênico, devemos fazer algumas considerações relativas à leitura dos resultados. A hidrólise do MUG pela β -glucuronidase produz 4-metilumbeliferona, que tem a propriedade de ser fluorescente quando exposta à luz UV (366nm) (FENG e HARTMAN, 1982). A intensidade da fluorescência da 4-metilumbeliferona depende do pH, que segundo MEAD e colab. (1955), é máxima em valores de pH entre 9 e 10. Desta forma, há necessidade de corrigir o pH do meio, após sua incubação, para melhor observação da fluorescência (CHANG e colab., 1989; DÖLLER e colab., 1990). Para exemplificar esta interferência, podemos citar o trabalho de DÖLLER e colab. (1990), que avaliaram o teste fluorogênico para detectar *Escherichia coli* a partir de amostras de urina, usando o ágar brovacin-Fluorocult, e observaram que 21% das respostas negativas e fracamente positivas desenvolviam fluorescência quando tratadas com NaOH.

No trabalho aqui apresentado, todos os tubos nos quais a leitura da fluorescência era difícil, por ser fraca ou aparentemente negativa, o valor do pH foi elevado para a faixa alcalina (8 a 10), utilizando solução de hidróxido de sódio 2N (conforme descrito no item 3.3.3) e a positividade da leitura era decidida nessas

condições. Na tabela 09 encontram-se as relações entre o número de tubos que apresentaram fluorescência antes e após a correção do pH. Com este procedimento observamos que, para os quatro grupos de amostras, nas leituras em 24h, ocorreu um aumento de 16,1% no número de tubos MUG positivos, ou seja, antes da correção do pH o número de tubos MUG positivos era de 514 e após a correção aumentou para 597. Nas leituras de 48h ocorreu um aumento de 7,9% no número de tubos MUG positivos, passando de 595 para 642 após a correção do pH (tabela 09).

Analisando separadamente os quatro grupos de alimentos (tabela 09), observa-se, com facilidade, algumas diferenças, abaixo discutidas.

Para leite cru, nas leituras de 24h, ocorreu um aumento de 20,6% no número de tubos fluorescentes após a correção do pH e nas leituras de 48h este aumento foi de 9,2%. Nas amostras de leite cru B ocorreram aumentos de 29,5 e 10,7% nas leituras de 24 e 48h, respectivamente, e para as amostras de leite cru C, os aumentos corresponderam a 16,8% para leituras de 24h e a 8,5% para as leituras de 48h.

Para queijo tipo Minas frescal, com a correção do pH, o número de tubos fluorescentes aumentou em 10,8% e 3,9% nas leituras de 24 e 48h, respectivamente.

No caso de leite pasteurizado tipo C, o aumento foi de 61,5% e 38,2% para as leituras de 24 e 48h, respectivamente. Neste caso, a possível explicação é que, quando se inocula 10 ou 1ml de leite no caldo BVB-MUG, ocorrem modificações significativas na composição deste, principalmente em relação a quantidade de carboidratos, uma vez que o leite é rico em lactose e, desta forma, tem como consequência a produção de uma maior quantidade de

ácidos a partir da fermentação destes açúcares e, por fim, a redução na capacidade fluorescente da 4-metilumbeliferona.

Já para sorvete, em 24h observou-se apenas um tubo fluorescente e, mesmo assim, só após a adição de NaOH. Nas leituras de 48h, ocorreu um aumento de 50,0% dos tubos fluorescentes após a correção do pH. No caso de sorvete, além da lactose, proveniente do leite, também existe a interferência de outros carboidratos utilizados na elaboração deste produto.

Como pode ser observado na tabela 09, os produtos que apresentaram mais problemas em relação ao pH para a leitura da fluorescência, em ordem decrescente, foram: sorvete, leite pasteurizado tipo C, leite cru e queijo tipo Minas frescal. Esse fato reforça a teoria da interferência da quantidade de carboidratos presentes nas amostras. Dentre estes produtos, o sorvete é o que apresenta maior quantidade de carboidratos. Entre o leite cru e o leite pasteurizado, não se pode dizer que são diferentes quanto a isto, porém, para o leite pasteurizado utilizou-se quantidades de 10; 1; 0,1 e 0,01ml da amostra, enquanto que no leite cru utilizou-se quantidades iguais ou inferiores a 0,1ml da amostra. Para o caso do queijo também foram utilizadas amostras diluídas (0,1g).

Além destas informações, a tabela 09 indica claramente que, após 48h de incubação, ocorre redução do número de tubos que precisam ter o pH do meio corrigido para que se possa observar a resposta fluorogênica. Este fato pode ter sua explicação na atividade metabólica dos microrganismos presentes nos tubos, ou seja, sendo os carboidratos os primeiros substratos alvos, inicialmente ocorre a acidificação do meio, porém, após a exaustão do meio em relação aos açúcares, estes microrganismos atacam outros componentes, neste caso, os de origem protéica, que caracteristicamente produzem metabólitos com capacidade de elevar o pH do meio e, conseqüentemente, facilitam a leitura da

fluorescência.

A necessidade de corrigir o pH do caldo da cultura antes de efetuar a leitura da fluorescência foi demonstrada por outros pesquisadores, como JACKSON e colab. (1992), que tiveram problemas com ágar MacConckey-MUG, e FARBER (1986), que também observou a interferência da ação fermentativa sobre a lactose, quando estudou a aplicação do MUG em conjunto com a técnica da membrana hidrofóbica.

Já quando o pH do meio é controlado, ocorre otimização da produção da fluorescência, como demonstraram RICE e colab. (1990) usando o sistema Colilert. Os autores testaram 720 cepas, das quais 620 eram *Escherichia coli* e destas 95,5 e 99,5% desenvolveram fluorescência em 24 e 48h, respectivamente. Também usando o sistema Colilert, porém para análise de água, COVERT e colab., 1989; EDBERG e colab., 1988; EDBERG e colab., 1990 e EDBERG e colab., 1991, concluíram que a flora heterotrófica não interfere no desenvolvimento da fluorescência, ao mesmo tempo que ocorre minimização das respostas falso positivas para os coliformes totais, uma vez que este sistema não está baseado na ação fermentativa sobre a lactose.

Em relação ao período de incubação, observou-se que após 48h ocorreu um aumento no número de tubos com resposta fluorogênica após adição de NaOH (tabela 09). Para o leite cru, o número de tubos MUG positivos passou de 175 (24h) para 190 (48h), representando um aumento de 8,6%. Analisando-se os resultados por tipo de leite cru, observa-se comportamentos semelhantes: para o leite cru B, ocorre um aumento de 8,8% (de 57 para 62) após 48h e para o leite tipo C, este aumento foi de 8,5% (de 118 para 128). No caso do queijo tipo Minas frescal ocorreu um aumento de 4,5%, de 379 tubos positivos em 24h passou para 396 após 48h. Para o leite pasteurizado tipo C o aumento foi de

11,9% (de 42 para 47) e para o sorvete o aumento foi de 800% (um tubo MUG positivo em 24h e passou para 9 tubos positivos em 48h). No entanto, é importante lembrar que a diferença entre os resultados das contagens de *Escherichia coli* pela técnica fluorogênica com resultados em 24 e em 48h foi estatisticamente significativa apenas para leite cru B e queijo tipo Minas frescal com $\alpha = 5$ ou 10% (tabela 08).

Estes dados estão de acordo com os resultados de JACKSON e colab. (1992), que também obtiveram maiores proporções de respostas MUG positivas após 48h de incubação.

Ainda em relação ao método fluorogênico, cabe-nos avaliar a eficiência das respostas bioquímicas observadas no caldo BVB ou LST, ambos com MUG (tabela 10 e 11). De acordo com os resultados apresentados nessas tabelas observa-se que as especificidades das respostas para MUG e para MUG/INDOL foram bastante semelhantes, em todos os alimentos testados. A especificidade da resposta para MUG e para MUG-INDOL foi alta para leite cru B (93,5 e 93,1%, respectivamente), para leite cru C (96,9 e 97,6%, respectivamente) e para queijo (99,2% para ambos os resultados). Para leite pasteurizado tipo C a especificidade foi mais baixa (62,5 e 83,3% para MUG e MUG-INDOL, respectivamente) e para o sorvete foi 0%.

É interessante observar que a especificidade da resposta para MUG foi maior em leite cru C (96,9%) do que em leite cru B (93,5%). O mesmo ocorre na resposta MUG-INDOL (97,6 e 93,1%, respectivamente).

Para as respostas falso positivas (Tabela 11), também não se observou acentuadas diferenças entre as respostas para MUG e para MUG/INDOL, exceto para o caso do leite pasteurizado tipo C, que a resposta

para MUG foi de 37,5% e resposta MUG/INDOL foi de 16,7%. As taxas de falso positivos para MUG foram de 4,2% para leite cru, de 0,7% para queijo tipo Minas frescal e de 100% para sorvete. Também não foram observadas muitas diferenças em relação às respostas falso negativas. Algumas diferenças entre as leituras para MUG e para MUG-INDOL foram observadas apenas nas amostras de leite cru.

Para a leitura da fluorescência, as taxas de respostas falso negativas foram: para leite cru (B e C), 10,4%; para leite cru B, 21,6%; para leite cru C, 3,9%; para queijo tipo Minas frescal, 4,1%; para leite pasteurizado tipo C, 7,4% e para sorvete, zero%.

Num estudo com leite cru usando LST-MUG, FENG e HARTMAN (1982) obtiveram 82% de confirmação dos tubos testados em caldo EC a 44,5°C, o que está abaixo dos valores que obtivemos. No entanto, a taxa de resultados falso negativos relatada foi de 5%, bastante semelhante àquela obtida em nosso estudo para leite cru C.

Já MOBERG e colab. (1985) utilizando o mesmo método (LST-MUG) não obtiveram respostas falso positivas para derivados de leite.

Ainda em relação as respostas falso negativas, devemos fazer duas considerações importantes.

A primeira é que em todos os grupos de amostras nos quais *Escherichia coli* foi detectada, foram isoladas algumas cepas que responderam negativamente ao teste do MUG, quando testadas em ágar PCA-MUG. O número destas cepas teve grande influência nas taxas de respostas falso negativas, variando de 0,8% a 13,5%, como pode ser observado na tabela 11.

A segunda é que, devido a algum tipo de interferência, algumas cepas de *Escherichia coli* MUG positivas, por motivos desconhecidos, não hidrolisaram o MUG no período de 48h, o que representou proporções de respostas falso negativas variando de 1,0 a 8,1%. Na tentativa de explicar esse fato, comparou-se os resultados da contagem de bactérias mesófilas (UFC/ml ou g) com os resultados da contagem de *Escherichia coli* (NMP/ml ou g), determinando-se a relação entre as duas contagens. Verifica-se que, quanto maior é a relação entre a contagem de bactérias mesófilas e o número de *Escherichia coli* em um alimento, maior é o número de resultados falso negativos (tabela 12).

Estes dados reforçam a suspeita de que o rápido abaixamento do pH, por ação metabólica das bactérias presente pode interferir na resposta fluorogênica, uma vez que o pH ótimo para a ação da β -glucuronidase é de 8,5 (KILIAN e BÜLOW, em 1976). Pode ocorrer, ainda, um efeito inibitório desta microbiota sobre a ação ou produção da enzima. Existem contradições nas opiniões dos pesquisadores com relação a essa interferência. Segundo FENG e HARTMAN (1982), as bactérias acompanhantes não afetam a resposta fluorogênica. Já JACKSON e colab. (1992); MOBERG e colab., 1988, suspeitaram que os microrganismos competidores podem afetar o crescimento ou a produção da enzima, favorecendo as respostas falso negativas, assim como MOBERG e colab. (1988), que utilizaram essa suposição para explicar a alta taxa de falsos negativos.

Analisando em função da variável tempo, o comportamento da produção de fluorescência, obtido neste estudo, indica que um prolongamento no período de incubação favorece a quantificação da *Escherichia coli*, como foi demonstrado para o caso do queijo tipo Minas frescal, provavelmente, devido à

elevação do pH do meio.

Conclusões semelhantes foram obtidas por MOBERG e colab. (1988) também com LST-MUG, porém, para produtos congelados e refrigerados, que obtiveram um aumento de 6,4% nas leituras de 48h. Já num trabalho conduzido por MOBERG (1985), ao estudar o método fluorogênico (LST-MUG) para alimentos observou que 24h eram suficientes para a estimação do número de *Escherichia coli*. Esses resultados indicam que o tempo de incubação também depende do tipo de alimento.

Na tabela 13 encontram-se as características fenotípicas das cepas de *Escherichia coli* isoladas dos quatro grupos de alimentos testados. Das 735 cepas submetidas aos testes bioquímicos propostos por EDWARDS e EWING (1986), 100% foram positivas para fermentação de glicose com produção de ácido e gás; 100% foram VM positivas; 97,3% não produziram H₂S; 96,0% produziram indol; 95,8% foram móveis; 79,9% descarboxilaram L-lisina. Nenhuma cepa foi positiva para os testes de VP, utilização de citrato, fermentação de celobiose, produção de L-triptofano desaminase de urease.

Em relação à metodologia clássica, observamos que a resposta de turvação e produção de gás no caldo EC a 44,5°C nem sempre está relacionada com a presença de *Escherichia coli*. Nestes estudos, a proporção de respostas positivas em caldo EC sem a recuperação de *Escherichia coli* variou de 6,5% (leite pasteurizado tipo C) a 89,5% (sorvete), conforme dados apresentados na tabela 14.

Num estudo mais detalhado, observamos que outras bactérias crescem no caldo EC quando incubado a 44,5°C, por 24h, principalmente dos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (tabela 15). Destes, a maior

proporção dos que produziram gás foram os gêneros *Klebsiella* (36,5%) e *Enterobacter* (13,5%). As espécies mais freqüentes foram *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter gergovia*.

De acordo com o exposto, a resposta de produção de gás em caldo EC a 44,5°C não é um indicador seguro de contaminação fecal, principalmente no caso de sorvete. Posição semelhante também foi relatada por PTAK e colab. (1973), que observaram que 30,0 e 40,0% dos coliformes fecais (44,5°C) positivos em amostras de água correspondiam a *Klebsiella* spp e que 2,5 e 6,0% correspondiam à *Enterobacter* spp. Segundo CAPLENAS e KANAREK (1984) e EDBERG e colab. (1986), as bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* são bactérias de origem ambiental e podem dar respostas falso positivas no teste de coliformes fecais (EC a 44,5°C).

Em função do que foi exposto e discutido, podemos estabelecer para a técnica fluorogênica as seguintes vantagens:

- * possibilita a contagem de *Escherichia coli* sem a necessidade do emprego de uma série bioquímica para confirmação;
- * permite a detecção de *Escherichia coli* em 24h;
- * apresenta especificidade alta para *Escherichia coli*;
- * apresenta resultados de fácil interpretação;
- * não requer grande quantidade de vidraria e diversidade de meios de cultura;
- * não requer manutenção de temperatura a 44,5°C;
- * requer menos tempo na realização de análise;
- * requer menos tempo no preparo de material de laboratório para análise;
- * é de menor custo.

E como desvantagens temos:

- * não permite a detecção de *Escherichia coli* MUG negativa;
- * em alguns tipos de alimentos a flora competidora pode interferir nos resultados;
- * alimentos que contém β -glucuronidase podem fornecer respostas falso positivas;
- * além dos equipamentos rotineiros de um laboratório de microbiologia de alimentos, requer uma câmara de luz ultra violeta.

Tabela 03: Resultados das contagens de *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em amostras de leite cru¹.

Amostras (Nº)	CPP ² (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)			Obs. ⁵
		MÉTODO CLASSICO ³	MÉTODO FLUOROGÊNICO ⁴		
			24h	48h	
01	1,2x10 ⁶	4,3x10 ²	4,3x10 ¹	4,3x10 ¹	1J,1D
02	1,8x10 ⁶	4,3x10 ²	4,3x10 ¹	4,3x10 ¹	1H
03	3,9x10 ⁵	4,3x10 ¹	9,0x10 ⁰	9,3x10 ⁰	1L,2I
04	7,7x10 ⁵	1,5x10 ²	1,5x10 ¹	4,3x10 ¹	2C,2D
05	6,9x10 ⁶	9,3x10 ²	7,5x10 ²	7,5x10 ²	2I,1D
06	3,8x10 ⁵	2,3x10 ¹	9,0x10 ⁰	9,0x10 ⁰	1C
07	3,8x10 ⁵	2,3x10 ⁰	4,0x10 ⁰	9,0x10 ⁰	2L
08	1,5x10 ⁶	1,1x10 ¹	1,5x10 ¹	1,5x10 ¹	1L,1J
09	8,4x10 ⁶	9,3x10 ¹	7,5x10 ¹	1,5x10 ²	1L
10	6,1x10 ⁵	9,3x10 ¹	4,0x10 ⁰	4,0x10 ⁰	1L,1H,1J
11	2,0x10 ⁶	9,3x10 ²	1,5x10 ³	1,5x10 ³	1L
12	8,3x10 ⁵	1,5x10 ²	2,3x10 ¹	2,3x10 ¹	2L,1I,2J
13	3,0x10 ⁶	2,1x10 ²	2,3x10 ¹	4,3x10 ¹	1L
14	4,6x10 ⁶	9,3x10 ¹	9,3x10 ¹	9,3x10 ¹	3L,1B
15	2,7x10 ⁶	4,3x10 ²	3,9x10 ¹	7,5x10 ¹	1C,1G,3H
16	4,6x10 ⁶	2,3x10 ³	9,3x10 ²	9,3x10 ²	1G
17	2,4x10 ⁶	4,3x10 ²	1,5x10 ²	1,5x10 ²	1C
18	6,5x10 ⁶	9,3x10 ¹	4,3x10 ¹	4,3x10 ¹	
19	6,4x10 ⁶	9,3x10 ¹	3,9x10 ¹	3,9x10 ¹	
20	1,7x10 ⁷	9,3x10 ³	4,6x10 ⁴	4,6x10 ⁴	1D
21	8,4x10 ⁷	7,5x10 ³	2,3x10 ²	1,6x10 ³	2L,2G
22	4,3x10 ⁶	4,3x10 ³	4,3x10 ³	4,3x10 ³	
23	4,9x10 ⁶	9,3x10 ¹	1,5x10 ²	1,5x10 ²	4L,1C
24	3,1x10 ⁶	2,1x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2,1x10 ⁴	1L,1H,1D
25	2,7x10 ⁶	2,3x10 ¹	2,3x10 ¹	9,3x10 ¹	
26	4,8x10 ⁸	9,3x10 ³	9,3x10 ²	2,3x10 ³	
27	5,7x10 ⁶	2,3x10 ²	4,3x10 ²	4,3x10 ²	1L,1G
28	1,0x10 ⁷	2,1x10 ³	2,3x10 ⁴	2,3x10 ⁴	1L,1C
29	1,1x10 ⁷	4,6x10 ⁴	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	1F
30	1,2x10 ⁷	4,3x10 ³	3,9x10 ²	4,3x10 ³	

¹ As amostras de nº 1 a 15 correspondem a leite cru B e as amostras de nº 16 a 30 correspondem a leite cru C

² Contagem padrão em placas de acordo com item 3.3.5.

³ Técnica dos tubos múltiplos de acordo com item 3.3.2.

⁴ De acordo com item 3.3.3 com leitura da fluorescência em 24 e 48h.

⁵ Número de tubos em situações especiais: para o método clássico L= produção de gás em EC a 44,5^oC sem *E. coli*, e para o método fluorogênico: B= MUG+ INDOL+ com *E. coli* MUG-; C= MUG+ INDOL+ sem *E. coli*; D= MUG+ INDOL- com *E. coli* MUG+; F= MUG+ INDOL- sem *E. coli*; G= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG+; H= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG-; I= MUG- INDOL- com *E. coli* MUG+; J= MUG- INDOL- com *E. coli* MUG-.

Tabela 04: Resultados das contagens de *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em amostras de queijo tipo Minas frescal.

Amostras (Nº)	CPP ¹ (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)			Obs. ⁴
		MÉTODO CLASSICO ²	MÉTODO FLUOROGÊNICO ³		
			24h	48h	
01	6,2x10 ⁶	4,3x10 ²	4,3x10 ²	4,3x10 ²	1L
02	8,6x10 ⁷	2,3x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2,1x10 ⁴	1L,1G,1B
03	4,6x10 ⁷	2,3x10 ²	2,3x10 ²	2,3x10 ²	
04	7,2x10 ⁷	4,3x10 ³	4,3x10 ³	4,3x10 ³	1H
05	2,0x10 ⁸	4,3x10 ⁴	4,3x10 ⁴	4,3x10 ⁴	1L,3H
06	2,4x10 ⁸	2,3x10 ⁶	7,5x10 ⁵	1,5x10 ⁶	2L,1I
07	2,3x10 ⁸	2,3x10 ⁴	4,3x10 ⁴	4,3x10 ⁴	4L,1H
08	6,5x10 ⁷	2,3x10 ³	2,1x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2L
09	1,5x10 ⁸	4,3x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,5x10 ⁵	
10	3,2x10 ⁸	4,0x10 ³	7,5x10 ²	7,5x10 ²	4L,1G
11	2,5x10 ⁸	4,3x10 ⁶	9,3x10 ⁵	9,3x10 ⁵	1H
12	1,2x10 ⁸	1,5x10 ⁴	4,3x10 ³	7,5x10 ³	
13	4,3x10 ⁸	9,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	1L
14	1,1x10 ⁸	9,3x10 ⁴	7,5x10 ⁴	7,5x10 ⁴	1L,1C
15	2,4x10 ⁸	9,3x10 ⁵	2,3x10 ⁵	2,4x10 ⁶	1B
16	6,2x10 ⁸	9,3x10 ³	2,1x10 ³	7,5x10 ³	1G,2H
17	1,1x10 ⁸	2,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	4,3x10 ⁶	
18	2,9x10 ⁹	4,6x10 ⁷	2,4x10 ⁷	2,4x10 ⁷	
19	3,0x10 ⁸	2,3x10 ³	1,5x10 ³	1,5x10 ³	
20	6,0x10 ²	<3,0	<3,0	<3,0	
21	1,6x10 ⁸	<3,0	<3,0	<3,0	
22	8,2x10 ⁸	1,5x10 ⁶	9,3x10 ³	9,3x10 ³	3H,2J
23	6,6x10 ⁸	4,3x10 ⁵	9,3x10 ⁵	2,3x10 ⁶	3L
24	7,7x10 ⁷	9,3x10 ⁵	9,3x10 ⁵	9,3x10 ⁵	1L
25	1,2x10 ⁹	1,1x10 ⁸	4,5x10 ⁷	4,6x10 ⁷	
26	3,2x10 ⁸	1,5x10 ⁶	1,6x10 ⁶	4,6x10 ⁶	1L,1B,1C
27	9,5x10 ⁷	7,5x10 ²	2,3x10 ²	4,3x10 ³	
28	6,9x10 ⁸	9,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2,3x10 ⁶	2L
29	5,2x10 ⁹	2,3x10 ⁶	4,3x10 ⁵	9,3x10 ⁵	6L
30	3,1x10 ⁸	1,4x10 ²	4,3x10 ¹	2,3x10 ²	2L,1C

¹ Contagem padrão em placas de acordo com item 3.3.5.

² Técnica dos tubos múltiplos de acordo com item 3.3.2.

³ De acordo com item 3.3.3 com leitura da fluorescência em 24 e 48h.

⁴ Número de tubos em situações especiais: para o método clássico L= produção de gás em EC a 44,5°C sem *E. coli*, e para o método fluorogênico: B= MUG+ INDOL+ com *E. coli* MUG-; C= MUG+ INDOL+ sem *E. coli*; G= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG+; H= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG-; I= MUG- INDOL- com *E. coli* MUG+; J= MUG- INDOL- com *E. coli* MUG-.

Tabela 05: Resultados das contagens de *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em amostras de leite pasteurizado tipo C.

Amostras (N ^o)	CPP ¹ (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)			Obs. ⁴
		MÉTODO CLASSICO ²	MÉTODO FLUOROGÊNICO ³		
			24h	48h	
01	9,5x10 ³	NR ⁵	NR	NR	
02	1,4x10 ⁴	NR	NR	NR	
03	> 5,0x10 ⁶	NR	NR	NR	
04	< 1,0x10 ³	NR	NR	NR	
05	7,5x10 ³	2,4x10 ¹	2,4x10 ¹	2,4x10 ¹	
06	1,2x10 ⁴	0,04	NR	NR	
07	2,7x10 ⁴	NR	0,23	0,23	3F
08	1,3x10 ⁴	NR	NR	NR	
09	8,5x10 ⁴	2,3x10 ¹	9,3x10 ⁰	9,3x10 ⁰	1L,1H
10	3,1x10 ⁴	NR	NR	0,03	1L,1C
11	2,1x10 ⁴	NR	NR	0,09	2F
12	3,4x10 ⁴	NR	NR	NR	
13	6,0x10 ⁵	2,4x10 ²	1,5x10 ²	1,5x10 ²	1G
14	9,7x10 ⁴	NR	NR	NR	
15	6,2x10 ⁴	NR	0,03	0,03	1F
16	1,1x10 ⁴	NR	NR	NR	
17	4,3x10 ⁴	NR	NR	NR	
18	2,4x10 ⁴	NR	2,4x10 ⁰	2,4x10 ⁰	6F
19	7,0x10 ³	NR	0,23	0,23	3C
20	9,7x10 ⁴	NR	0,04	0,04	1C
21	1,5x10 ⁴	NR	NR	0,04	1F
22	7,8x10 ⁴	NR	NR	NR	
23	3,3x10 ⁴	NR	NR	NR	
24	4,8x10 ³	NR	NR	NR	
25	3,5x10 ⁴	NR	04	0,04	1F
26	2,5x10 ⁴	NR	0,04	0,04	1F
27	2,6x10 ⁴	NR	NR	NR	
28	4,4x10 ⁴	NR	NR	0,03	1C
29	8,7x10 ²	NR	NR	NR	
30	1,7x10 ²	0,03	NR	NR	

¹ Contagem padrão em placas de acordo com item 3.3.5.

² Técnica dos tubos múltiplos de acordo com item 3.3.2.

³ De acordo com item 3.3.3 com leitura da fluorescência em 24 e 48h.

⁴ Número de tubos em situações especiais: para o método clássico L= produção de gás em EC a 44,5°C sem *E. coli*, e para o método fluorogênico: C= MUG+ INDOL+ sem *E. coli*; F= MUG+ INDOL- sem *E. coli*; G= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG+; H= MUG- INDOL+ com *E. coli* MUG-.

⁵ Não recuperado (<0,03 NMP/ml)

Tabela 06: Resultados das contagens de *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em amostras de sorvete.

Amostras (Nº)	CPP ¹ (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)			Obs. ⁴
		MÉTODO CLASSICO ²	MÉTODO FLUOROGÊNICO ³		
			24h	48h	
01	9,9x10 ⁵	NR ⁵	NR	NR	
02	1,0x10 ²	NR	NR	NR	
03	2,0x10 ²	NR	NR	NR	
04	3,9x10 ³	NR	NR	NR	
05	2,9x10 ⁵	NR	NR	4,0	4L,1C
06	7,2x10 ⁵	NR	NR	NR	
07	1,2x10 ⁴	NR	NR	4,0	1C
08	8,7x10 ⁴	NR	NR	2,3X10 ¹	1L,2C,1F
09	1,1x10 ⁶	NR	NR	NR	
10	1,3x10 ⁴	NR	NR	NR	
11	3,9x10 ⁵	NR	NR	NR	
12	2,5x10 ⁶	NR	NR	NR	
13	1,7x10 ⁴	NR	NR	NR	
14	1,3x10 ⁶	NR	NR	NR	
15	1,4x10 ⁶	NR	NR	NR	
16	1,3x10 ⁶	NR	NR	NR	
17	5,2x10 ⁴	NR	NR	NR	
18	3,3x10 ⁴	NR	NR	NR	
19	2,5x10 ⁴	NR	NR	NR	
20	2,5x10 ⁴	NR	NR	NR	
21	7,5x10 ³	NR	NR	NR	
22	4,9x10 ³	NR	NR	NR	
23	1,1x10 ⁴	NR	NR	NR	
24	2,2x10 ⁴	NR	NR	NR	
25	3,3x10 ⁴	NR	4,0	4,0	1C
26	9,4x10 ⁴	NR	NR	NR	3L,1C,1F
27	4,6x10 ⁴	NR	NR	NR	6L
28	1,4x10 ⁸	7,0	NR	4,0	2L,1C
29	8,3x10 ⁴	NR	NR	NR	1L
30	2,2x10 ⁴	NR	NR	NR	

¹ Contagem padrão em placas de acordo com item 3.3.5.

² Técnica dos tubos múltiplos de acordo com item 3.3.2.

³ De acordo com item 3.3.3 com leitura da fluorescência em 24 e 48h.

⁴ Número de tubos em situações especiais: para o método clássico L= produção de gás em EC a 44,5°C sem *E.coli*, e para o método fluorogênico: C= MUG+ INDOL+ sem *E. coli*; F= MUG+ INDOL- sem *E. coli*.

⁵ Não recuperado (<0,03 NMP/g).

Tabela 07: Análise de variância das médias das contagens de *Escherichia coli* obtidas pelas metodologias clássica, fluorogênica com leitura em 24h (MUG 24h) e fluorogênica com leitura em 48h (MUG 48h).

Alimento		Média do NMP (\log_{10})		
		Clássico	MUG 24h	MUG 48h
Leite cru	n = 30	2,628 ^{h,p}	2,281 ^{a,p}	2,433 ^{a,h}
	n = 27	2,631 ^{b,i}	2,366 ^{c,l}	2,524 ^{b,c}
Leite cru B	n = 15	2,054 ^{q,r}	1,529 ^{d,q}	1,641 ^{d,r}
	n = 12	2,003 ^{m,n}	1,616 ^{o,m}	1,732 ^{o,n}
Leite cru C	n = 15	3,201 ^f	3,032 ^f	3,225 ^f
Queijo tipo	n = 30	5,084 ^{g,s}	4,733 ^{l,o,s}	4,973 ^{g,o}
Minas frescal				

a,b,c,d,e,f,g são equivalentes com $\alpha = 1; 5$ ou 10% .

h,i,j,l,m,n,o são equivalentes com $\alpha = 1\%$ porém, não são equivalentes com $\alpha = 5$ e 10% .

p,q,r,s Não são equivalentes com $\alpha = 1; 5$ ou 10% .

Tabela 08: Equivalência das médias das contagens de *Escherichia coli* obtidas pelas metodologias clássica e fluorogênica, em função do tipo de alimento e do nível de significância (α).

Alimento	$\alpha = 1\%$			$\alpha = 5 \text{ ou } 10\%$		
	MC ¹ x MUG 24	MC x MUG 48	MUG 24 x MUG 48	MC x MUG 24	MC x MUG48	MUG 24 x MUG48
Leite cru (n = 27)	sim ²	sim	sim	não	sim	sim
leite cru B (n = 12)	sim	sim	sim	não	não	não
Leite cru C (n = 15)	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Queijo tipo Minas frescal (n = 28)	não	sim	sim	não	sim	não

¹ MC= método clássico dos tubos múltiplos, MUG 24= método fluorogênico com leitura em 24h e MUG 48= método fluorogênico com leitura em 48h.

² sim = são equivalentes e não = não são equivalentes.

Tabela 09: Relação entre o número de tubos fluorescentes antes e após a adição de NaOH 2N na detecção de *Escherichia coli* pelo método fluorogênico em amostras de leite e derivados.

Alimento (Nº)	Número de tubos fluorescentes					
	24h			48h		
	+ ¹	+ ² NaOH	Total	+ ¹	+ ² NaOH	Total
Leite cru (B,C) ³ (30)	145	30 (20,6) ⁵	175	174	16 (9,2)	190
Leite cru B ³ (15)	44	13 (29,5)	57	56	6 (10,7)	62
Leite cru C ³ (15)	101	17 (16,8)	118	118	10 (8,5)	128
Queijo tipo Minas frescal ⁴	342	37 (10,8)	379	381	17 (3,9)	396
Leite pasteu- rizado tipo C ³	26	16 (61,5)	42	34	13 (38,2)	47
Sorvete ⁴ (30)	1	1 (100,0)	2	6	3 (50,0)	9
TOTAL (120)	514	83 (16,1)	597	595	47 (7,9)	642

¹ Tubos fluorescentes sem adição de NaOH.

² Tubos fluorescentes com adição de NaOH.

³ O caldo de cultura usado foi BVB-MUG.

⁴ O caldo de cultura usado foi LST-MUG.

⁵ Aumento do número de tubos MUG+ após a adição de NaOH, em %.

Tabela 10: Relação entre as leituras de turvação, produção de gás e de indol e fluorescência nos tubos com caldo LST-MUG e BVB-MUG e a recuperação de *Escherichia coli* (resultados em número de tubos).

Leitura nos tubos ¹				Recuperação de <i>Escherichia coli</i> ²		
Turv.	Gás	Indol	Mug ³	Presente ⁴		Ausente
				Mug+	Mug-	
LEITE CRU						
+	+	+	+	174	1	7
+	+	-	+	6	0	1
+	+	+	-	5	6	-
+	+	-	-	5	5	-
LEITE CRU B						
+	+	+	+	53	1	4
+	+	-	+	4	0	0
+	+	+	-	1	5	-
+	+	-	-	5	5	-
LEITE CRU C						
+	+	+	+	122	0	3
+	+	-	+	2	0	1
+	+	+	-	4	1	-
+	+	-	-	0	0	-
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL						
+	+	+	+	390	3	3
+	+	-	+	0	0	0
+	+	+	-	3	11	-
+	+	-	-	1	2	-
LEITE PASTEURIZADO TIPO "C"						
+	+	+	+	25	0	5
+	+	-	+	0	0	10
+	+	+	-	1	1	-
+	+	-	-	0	0	-
SORVETE						
+	+	+	+	0	0	6
+	+	-	+	0	0	3
+	+	+	-	0	0	-
+	+	-	-	0	0	-

¹ Leitura nos tubos com caldo LST-MUG ou BVB-MUG em 48h.

² De acordo com a técnica descrita no item 4.3.3.

³ Observação com e sem uso de NaOH.

⁴ Cepas de *E.coli* MUG positivas e negativas testadas em PCA-MUG.

Tabela 11: Comparação entre a leitura da fluorescência e a combinação das leituras da fluorescência e indol nos caldos de enriquecimento, na detecção de *Escherichia coli* pelo método fluorogênico.

Alimento	MUG+			MUG+ e INDOL+		
	Especi- ficidade (%)	Falso positivo (%)	Falso negativo (%)	Especi- ficidade (%)	Falso positivo (%)	Falso negativo (%)
Leite cru (B,C)	95,7	4,2	10,4 (5,4) [†]	96,1	3,8	13,4 (5,4)
Leite cru B	93,5	6,4	21,6 (13,5)	93,1	6,9	27,0 (13,5)
Leite cru C	96,9	3,1	3,9 (0,8)	97,6	2,4	5,4 (0,8)
Queijo tipo Minas frescal	99,2	0,7	4,1 (3,2)	99,2	0,7	4,1 (3,2)
Leite pasteu- rizado tipo C	62,5	37,5	7,4 (3,7)	83,3	16,7	7,4 (3,7)
Sorvete	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0

[†] Proporção de respostas falso negativas com recuperação de *E. coli* MUG- (%).

Tabela 12: Influência da relação entre a quantidade de bactérias mesófilas e de *Escherichia coli* em alimentos na ocorrência de resultados falso negativos no método fluorogênico para a enumeração de *Escherichia coli*.

Alimento	CPP/NMP ¹	Falso negativo ² (%)
Leite cru B	8889	8,1
Leite cru C	6811	3,1
Queijo tipo Minas frescal	82	0,9

¹ Contagem padrão em placas-mesófilos (UFC/ml ou g)/ *E.coli* (NMP/ml ou g).

² Resposta fluorogênica negativa porém com recuperação de *E.coli* MUG +.

Tabela 13: Características fenotípicas das cepas de *Escherichia coli* isoladas de quatro grupos de alimentos¹.

Alimento	Nº de cepas	Provas bioquímicas			
		INDOL +	LISINA	MOTIL +	H2S +
Leite cru	356	342 (96,1) ³	338 (94,9)	343 (96,3)	350 (98,3)
Queijo tipo Minas frescal	331	320 (96,7)	210 (63,3)	315 (95,2)	321 (97,0)
Leite pasteurizado tipo "C"	46	42 (91,3)	37 (80,3)	46 (100,0)	44 (95,6)
Sorvete	2	2 (100,0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Total	735	706 (96,0)	587 (79,9)	704 (95,8)	715 (97,3)

¹ As cepas foram isoladas e identificadas segundo as metodologias descritas nos itens 3.2; 3.3 e 3.4.

² As cepas apresentaram positividade de 100% para os testes de glicose (ác. e gás) e VM, e 0% para os testes de VP, citrato, celobiose, L-triptofano desaminase e urease.

³ Porcentagem em relação ao número de cepas testadas.

Tabela 14: Relação entre as respostas de turvação e produção de gás em caldo EC a 44,5°C e o isolamento de *Escherichia coli* através da metodologia clássica dos tubos múltiplos em quatro grupo de alimentos (resultados em número de tubos).

Alimento	Caldo EC (44,5°C/24h)	
	GÁS +	<i>E. coli</i> + (%)
Leite cru (B e C)	234	212 (90,6)
Leite cru B	96	87 (90,6)
Leite cru C	138	115 (90,6)
Queijo tipo Minas frescal	432	400 (92,6)
Leite past. tipo C	31	29 (93,5)
Sorvete	19	2 (10,5)

Tabela 15: Gêneros de bactérias diferentes de *Escherichia coli* isolados de caldo EC após incubação a 44,5°C, por 24h.

Gênero	Nº de cepas identificadas	Nº de cepas testadas em caldo EC a 44,5°C	
		Testadas	Positivas
<i>Enterobacter</i>	185	37	5 (13,5%) ¹
<i>Klebsiella</i>	82	30	11 (36,7%)
<i>Citrobacter</i>	49	12	1 (8,3%)
<i>Serratia</i>	4	1	0 (0%)
<i>Escherichia</i> (exceto <i>E. coli</i>)	1	1	0 (0%)
Total	321	81	17 (21,0%)

¹ Porcentagem em relação ao número de cepas testadas

5. CONCLUSÕES

1. A técnica fluorogênica pode ser usada para a detecção e enumeração de *Escherichia coli* em leite cru com resposta em 24h e para queijo tipo Minas frescal com resposta em 48h, obtendo-se resultados equivalentes aos fornecidos pela técnica clássica dos tubos múltiplos.

2. Para leite pasteurizado tipo C, o método fluorogênico só pode ser utilizado para testar quantidades iguais ou menores que 0,1ml.

3. Para leite pasteurizado tipo C (com alíquotas de 10 e 1ml) e sorvete, o MUG deve ser incorporado apenas no caldo de enriquecimento secundário, devido às altas taxas de respostas falso positivas no caldo de enriquecimento primário.

4. A acidificação rápida do meio de cultura, durante o período de incubação, afeta negativamente o método fluorogênico. É necessária, portanto, a correção do pH do caldo de cultura antes da leitura da fluorescência para evitar resultados falso negativos.

5. Quanto maior a relação entre a contagem total de bactérias mesófilas e a contagem de *Escherichia coli* no alimento, maior é a taxa de respostas falso negativas para *Escherichia coli* no método fluorogênico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABGRALL, B. & CLERET, J.J. Evaluation of PetrifilmTM SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. J.Food Prot., Ames, 53(3):213-216, 1990.

ALVAREZ, R.J. Use of fluorogenic assays for the enumeration of *Escherichia coli* from selected seafoods. J.Food Sci., Chicago, 49(4):1186-1187, 1232, 1984.

ANDREWS, W.H.; DURAN, D.P.; McCLURE, F.D.; GENTILE, D.E. Use of two rapid A-1 methods for the recovery of fecal coliforms and *Escherichia coli* from selected food types. J.Food Sci., Chicago, 44(1):289-291, 1979.

ANDREWS, W.H.; WILSON, C.R.; POELOMA, P.L. Glucuronidase assay in a rapid MPN determination for recovery of *Escherichia coli* from selected foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 70(1):31-34, 1987.

ANDREWS, W.H.; WILSON, C.R.; POELOMA, P.L.; BULLOCK, L.K.; McCLURE, F.D.; GENTILE, D.E. Interlaboratory evaluation of the AOAC method and the A-1 procedure for recovery of fecal coliforms from foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 64(5):1116-1121, 1981.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis, 15. ed., Arlington, 1990. V. 1, p. 684.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of dairy products, 14. ed., Washington, DC, 1978.

* De acordo com a NB66/78 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

- BAGLEY, S.T & SEIDER, R.J. Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 33(5):1141-1148, 1977.
- BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A.; CORNAX, R.; BORREGO, J.J.; TORDEGROSSA, V.M.; GAUTHIER, M.J. Modifiel most-probable-number technic for the specific determination of *Escherichia coli* from enviromental samples using a fluorogenic method. J. Microbiol. Methods, Amsterdam, 12:235-245, 1990.
- BRANCHER, I. Avaliação da técnica de membrana filtrante para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em leite e derivados. São Paulo, 1992. 88p. (Dissertação de mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- BUEHLER, H.J.; KATZMAN, P.A.; DOISY, E. Studies on β -glucuronidase from *Escherichia coli*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 76:672-676, 1951.
- CAPLENAS, N.R. & KANAREK, M.S. Thermotolerant nonfecal source of *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal clifor test in recreation waters. Am. J. Public Health, Washington, DC, 74:1273-1275, 1984.
- CASELLAS, J.M. & ORDUNA, M.E. Método rápido para detección de *Escherichia coli* a partir de urocultivos. Acta Bioquim. Clín. Latinoame. La Plata, 22(4):531-535, 1988.
- CHANG, G.W.; BRILL, J.; LUM, R. Propotion of β -D-glucuronidase - negative *Escherichia coli* in human fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. Washington, DC, 55(2): 335-339, 1989.
-

- CLARK, D.L.; MILNER, B.B.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L.; OLSON, B.H.
Comparative study of commercial 4-methylumbellifery- β -D-glucuronide preparations with the standard methods membrane filtration fecal coliform test for the detection of *Escherichia coli* in water samples. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 57(5):1528-1534, 1991.
- CURIALE, M.S.; FAHEY, P.; FOX, T.L.; McALLISTER, J.S. Dry rehydratable film for enumeration of coliforms and aerobic bacteria in dairy products: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 72(2):312-318, 1989.
- CURIALE, M.S.; SON, T.; McIVER, D.; McALLISTER, J.S.; HALSEY, B.; ROBLEE, D.; FOX, T. & cols. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 74(4):635-648, 1991.
- COVERT, T.C.; SHADIX, L.C.; RICE, E.W.; HAINES, J.R. FREYBERG, R.W.
Evaluation of the autoanalysis colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 55(10):2443-2447, 1989.
- DAMARE, S.M.; CAMPBELL, D.F.; JOHNSTON, R.W. Simplified direct plating method for enhanced recovery of *Escherichia coli* in food. J. Food Sci., Chicago, 50:1736-1737, 1746, 1985.
- DAMOGLU, A.P.; BUICK, R.; HOUGH, B. A fluorogenic technique for the confirmation and enumeration of *Escherichia coli* in beansprouts. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, 7:177-179, 1988.

- DÖLLER, P.C.; HEIZMANN, W.R.; WERNER, H. Rapid identification of *Escherichia coli* in monomicrobial urine specimens by a fluorogenic assay. J. Microb. Methods, Amsterdam, 12:51-55, 1990.
- DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colits, Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 48:2256-2259, 1984.
- DUFOUR, A.P. & CABELLI, V.J. Membrane filter procedure for enumerating the component genera of the coliform group in seawater. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 29:823-833, 1975.
- EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B. and THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 54(6):1595-1601, 1988.
- EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B. Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC, 74(3):526-529, 1991.
- EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B.; KRIZ, N.J. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 56(2):366-369, 1990.
-

EDBERG, S.C. & KONTRICK, C.M. Comparison of β -glucuronidase - based substrate systems for identification of *Escherichia coli*, J.Clin. Microbiol. Washington, DC, 24(1):368-371, 1986.

EDBERG, S.C.; PISCITELLI, V.; CARTTER, M. Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 52:474-478, 1986. (errata 53:214, 1987).

EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 55(4):1003-1008, 1989.

EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of the Enterobacteriaceae, 4 ed., New York, Elsevier, 1986.p. 536.

ENTIS, P. Hydrophobic grid membrane filter/MUG method for total coliform and *Escherichia coli* enumeration in: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 72(6):936-950, 1989.

ENTIS, P. Enumeration of coliforms in nonfat dry milk and canned custard by hydrophobic grid membrane filter method: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 66(4):897-904, 1983.

FARBER, J.M. Potential use of membrane filter and a fluorogenic reagent - based solid medium for the enumeration of *Escherichia coli* in foods. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., Ottawa, 19:34-37, 1986.

- FENG, P.; LUM, R.; CHANG, G.W. Identification of *inid* A gene sequences in β -glucuronidase - negative *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 57(1):320-323, 1991.
- FENG, P.C.S. & HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 43(6):1320-1329, 1982.
- FRAMPTON, E.W.; RESTAINO, L.; BLASZKO, N. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide (X-GLUC) in a 24-hour direct plating method for *Escherichia coli*. J. Food Prot., Ames, 51(5):402-404, 1988.
- GAUTHIER, J.; TORREGROSSA, V.M.; BABELONA, M.C.; CORNAX, R. BORREGO, J.J. An intercalibration study of the use of 4-methylumbelliferyl- β - δ -glucuronide for the specific enumeration of *Escherichia coli* in seawater and marine sediments. Lett. Appl. Microbiol. 14(2):138-139, 1991.
- GINN, R.E.; PACKRD, V.S.; FOX, T.L.; Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 69(3):527-531, 1986.
- GLAESER, H. & HANGST, E. Rapid detection of *Escherichia coli* in soft cheese using a simple fluorogenic test. Deutsche Molkerei-Zeitung. 107(36):1170,1172-1174, 1986. Apud: Food Sci. Technol. Abstr., Shinfield, 19(8): abstr. n. 8P101, 1987.

- HARTMAN, P.A.; PETZEL, J.P.; KASPAR, C.W. New methods for indicator organisms. In: PIERSON, M.D. & STERN, N.J., eds. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology. New York, Macel Dekker, 1985. p. 175-217.
- JACSON, L.; LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A. β -glucuronidase activities of fecal isolates from healthy swine. J. Clin. Microbiol., Washington, DC, 30(8):2113-2117, 1992.
- KASPAR, C.W.; HARTMAN, P.A.; BENSON, A.K. Coagglutination and enzyme capture tests for detection of *Escherichia coli* β -galactosidase, β - glucuronidase, and glutamate decarboxylase. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 53(5)1073-1077, 1987.
- KILIAN, M. & BULOW, P. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, Copenhagen, 84:245-251, 1976.
- KOBURGER, J.A. & MILLER, M.L. Enumeration of a fluorogenic MNP procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. J. Food Prot., Ames, 48(3):244-245, 1985.
- LE MINOR, L. Tetrionate reductase, β -glucuronidase and ONPG-test in the genus *Salmonella*. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. 1 Orig. A, Stuttgart, 243:321-325, 1979.
- LEE, R.M. & HARTMAN, P.A. Inexpensive, disposable presence-absence test for coliforms and *Escherichia coli* in water. J. Food Prot., Ames, 52(3):162-164, 1989.

- LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L., eds. Tratado de microbiologia. São Paulo, Manole, 1988, V. 1, p. 1-81.
- LEY, A.N.; BOWERS, R.J.; WOLFE, S. Indoxil- β -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples. Can. J. Microbiol., Ottawa, 34(5):690-693, 1988.
- MATNER, R.R.; FOX, T.L.; MCIVER, D.E.; CURIALE, M.S. Efficacy of PetrifilmTM *Escherichia coli* count plates for *Escherichia coli* and coliform Enumeration. J. Food. Prot., Ames, 53(2):145-150, 1990.
- MEAD, J.A.R.; SMITH, J.N.; WILLIAMS, R.T. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorometric determination of β -glucuronidase. Biochem. J., London, 61:569-574, 1955.
- MEHLMAN, I.J. Coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli*. in : SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed., Washington, DC, APHA, 1984. p. 265-285.
- MOBERG, L.J. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in food. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 50(6):1383-1387, 1985.
- MOBERG, L.J.; WAGNER, M.K.; KELLEN, L.A. Fluorogenic Assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and Frozen foods: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, 71(3):589-602, 1988.

MOTES Jr, M.L. & PEELER, J.T. Field evaluation of the MUG assay for enumerating *Escherichia coli* in seawater and oysters from southeastern United States. J. Food Prot., Ames, 54(4):246-248, 1991.

NELSON, C.L.; FOX, T.L.; BUSTA, F.F. Evaluation of dry medium (Petrifilm VRB) for coliform enumeration. J. Food Prot., Ames, 47(7):520-525, 1984.

PETERSON, E.H.; NIERMAN, M.L.; RUDE, R.A.; PEELER, J.T. Comparison of AOAC method and fluorogenic (MUG) assay for enumerating *Escherichia coli* in foods. J. Food Sci., Chicago, 52(2):409-410, 1987.

POELMA, P.L.; WILSON, C.R.; ANDREWS, W.H. Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC, 70(6):991-993, 1987.

PTAK, D.J.; GINSBURG, W.; WILLEY, B.F. Identification and incidence of *Klebsiella* in chlorinated water supplies. J. Am. Water Works Assoc., Denver, 65:604-608, 1973.

RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R.; BEZANSON, G.S.; KASATIYA, S. Characterization of *Escherichia coli* sorotype O157:H7. J. Clin. Microbiol., Washington, DC, 26:2006-2012, 1988.

RESTAINO, L. & LYON, R.H. Efficacy of PetrifilmTM VRB for enumerating coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. J. Food Prot., Ames, 50(12):1017-1022,1047, 1987.

RICE, E.W.; ALLEN, M.J.; BRENNER, D.J. EDBERG, S.C. Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 57(2):592-593, 1991.

- RICE, E.W.; ALLEN, M.J.; EDBERG, S.G. Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 56(5):1203-1205, 1990.
- RIPPEY, S.R.; CHANDLER, L.A.; WATKINS, W.D. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shellfish. J. Food Prot., Ames, 50(8):685-690, 1987.
- ROBINSON, B. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in Foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 48(2):285-288, 1984.
- SHARPE, A.N.; PARRINGTON, L.J.; DIOTTE, M.P.; PETERKIN, P.I. Evaluation of indoxyl- β -D-glucuronide and hydrophobic grid membrane filters for electronic enumeration of *Escherichia coli*. Food Microbiol., London, 6(4):267-268, 1989.
- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM-Modificação do meio de Rugai e Araujo para a realização simultânea dos teste de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol., São Paulo, 13(4):309-315. 1982a.
- TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILi-Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisana descarboxilase. Rev. Microbiol., São Paulo, 13(3):230-235, 1982b.
- TRAPETA, R.W. & EDBERG, S.C. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., Washington, DC, 19(2):172-174, 1984.

WATKINS, W.D.; RIPPEY, S.R.; CLAVET, C.R.; KELLEY-REITZ, D.J.; BURKHARDT III, W. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, DC, 54(7):1874-1875, 1988.

WEISS, L.H. & HUMBER, J. Evaluation of a 24-hour fluorogenic assay for the enumeration of *Escherichia coli* from foods. J. Food Prot., Ames, 51(10):766-769, 1988.

WINER, B.J. Statistical Principles in experimental Design, 2.ed. New York, McGraw-Hill, 1971. p. 907.

RESUMO

Esse trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar o método fluorogênico (MUG), baseado na atividade β -glucuronidásica de *Escherichia coli*, para determinação rápida da presença desse microrganismo em leite e derivados, fazendo-se uma comparação da sua eficiência com o método clássico dos tubos múltiplos. O método MUG emprega caldo lactosado lauril sulfato triptose (ou caldo lactosado bile verde brilhante com bile a 2%) suplementados com 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG). Após a incubação a 35°C, por 24/48h, fez-se a determinação do número mais provável de *Escherichia coli* por g (ou ml) do produto a partir da observação da fluorescência nos caldos.

O trabalho foi desenvolvido com 120 amostras (leite cru, leite pasteurizado, queijo tipo Minas frescal e sorvete).

O método fluorogênico foi equivalente ($\alpha=1\%$) ao método clássico, dos tubos múltiplos, para leite cru quando a leitura foi feita com 24h de incubação e para queijo quando a leitura foi feita com 48h de incubação. Quando a leitura foi feita em 48h verificou-se equivalência entre os dois métodos para $\alpha=1; 5; 10\%$ para os dois produtos. O método fluorogênico não se revelou adequado para enumeração de *Escherichia coli* em leite pasteurizado e sorvete devido ao elevado número de resultados falso positivos.

Para leite cru, queijo, leite pasteurizado e sorvete a especificidade foi de 95,7; 99,2; 62,5 e 0,0%, respectivamente e a taxa de respostas falso negativas foi de 10,4; 4,1; 7,4; e 0,0%, respectivamente.

Conclui-se que o método fluorogênico pode ser usado para detectar e enumerar *Escherichia coli* em leite cru, em 24h e em queijo, em 48h, como uma alternativa para a metodologia clássica dos tubos múltiplos. Dentre as inúmeras vantagens do método recomendado estão a obtenção rápida de resultados e a redução nos custos.

SUMMARY

This study was carried out to evaluate a fluorogenic method (MUG), based on the activity of β -glucuronidase produced by *Escherichia coli*, in the rapid determination of the presence of this microorganism in milk and dairy products. The efficiency of this method was compared with by the classical multiple tube technique (NMP). The MUG technique was carried out with Lauryl Tryptose Broth (or Brilliant Green Bile 2% Broth) supplemented with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide. After incubation (35°C, 24-48h), the most probable number of *Escherichia coli* per g (or ml) of the product was determined observing the fluorescence of the positive tubes.

One hundred and twenty food samples were analysed: raw and pasteurized milk, Minas frescal cheese and ice-cream.

The fluorogenic technique was equivalent to the classical multiple tube technic ($\alpha=1\%$), after 24h of incubation, when raw milk was analysed. Results obtained after 48h for raw milk and Minas frescal cheese showed a better equivalence ($\alpha= 1, 5$ or 10%). The MUG method is not indicated for detection of *Escherichia coli* in pasteurized milk and in ice-cream because of the high number of false positive results.

The specificity of the MUG test was 95.7% for raw milk, 99.2% for Minas frescal cheese, 62.5% for pasteurized milk and 0% for ice-cream. The index of false negative results were 10.4% for raw milk, 4.1% for Minas frescal cheese, 7.4% for pasteurized milk and 0% for ice-cream.

The raising of the pH of the broth containing MUG, after the incubation period, increased significantly the number of positive results.

We concluded that MUG method may be used for detection and enumeration of *Escherichia coli* in raw milk and in Minas frescal cheese, and that it is also a good alternative method. Among the advantages, the short time for obtaining the results and the reduction of analysis costs were considered the most important.
