

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA, ÁCIDA E A DESINFETANTES
DE CEPAS DE *Escherichia coli* O157:H7 ISOLADAS NO SUL DO BRASIL**

TESE DE DOUTORADO

CHEILA MINÉIA DANIEL DE PAULA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre, abril de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

de Paula, Cheila Minéia Daniel
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA, ÁCIDA E A
DESINFETANTES DE CEPAS DE Escherichia coli O157:H7
ISOLADAS NO SUL DO BRASIL / Cheila Minéia Daniel de
Paula. -- 2014.
136 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. E. coli O157:H7. 2. resistência térmica. 3.
resistência ácida. 4. desinfecção. I. Tondo, Eduardo
Cesar, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio e amor incondicionais, sempre.

As amigas Marcia Loiko e Cláudia Hessel, por estarem presentes nas horas em que mais precisei.

Ao Fernando, pelas noites em claro, o café na madrugada, as escapadinhas ao cinema, mas principalmente, pelo companheirismo, amor, amizade e muita paciência.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, pela orientação, pelo exemplo profissional, por sempre acreditar na minha capacidade e nunca deixar exigir de mim no mínimo o meu melhor.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, por ter estado sempre presente em todos os momentos decisivos da minha formação (TCC, dissertação e por fim tese de doutorado) e pelo exemplo de profissional.

A minha amiga e colega Letícia Casarin, pela parceria ao longo de toda essa caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, pela parceria, amizade e muito café.

A Vera Masutti, pela amizade e por todas as vezes que esteve disposta a me ouvir.

Ao meu querido bolsista de Iniciação Científica, Diego Muller, pelo trabalho incansável de autoclavar tips e distribuir placas, formam algumas centenas.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente possibilitaram a conclusão deste trabalho.

AValiação DA RESISTÊNCIA TéRMICA, ÁCIDA E A DESINFETANTES DE CEPAS DE *Escherichia coli* O157:H7 ISOLADAS NO SUL DO BRASIL

Autor(a): Cheila Minéia Daniel de Paula

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

¹RESUMO

Escherichia coli O157:H7 é um dos patógenos alimentares mais importantes da atualidade, e, recentemente, diversas cepas desse microrganismo foram isoladas no sul do Brasil. O objetivo deste trabalho foi caracterizar duas cepas de *E. coli* O157:H7, através da avaliação de sua resistência térmica, ácida e comportamento frente a diferentes desinfetantes e procedimentos de higienização de vegetais folhosos. Resultados demonstraram a redução significativa das contagens bacterianas, após 3 minutos a 60°C, 2 minutos a 65°, 1 minuto a 70, 72° C e 75°C. Contudo, após adaptação ácida, nenhuma das cepas foi inativada a 60°C, por até 3 minutos. A 70°C foi observado aumento significativo da resistência térmica apenas para a CC. Em relação à resistência ácida, ambas as cepas sobreviveram quando expostas ao meio TSBm a diferentes pH entre 2,0 a 9,5 ajustados com ácido clorídrico e ácido propiônico (AP). Apenas, o meio com pH 2,0, ajustado com AP, foi capaz de reduzir significativamente às contagens de ambas as cepas. Na avaliação da resistência aos desinfetantes, álcool etílico (96°Gl e 70%) e quaternário de amônio foram capazes de inativar ambas as cepas, mesmo na presença de matéria orgânica. O ácido orgânico, na concentração recomendada pelo fabricante e o dobro dessa concentração, reduziu cerca de 90% das contagens, após 5 minutos de exposição. O dicloroisocianurato de sódio só apresentou reduções significativas quando foram utilizadas duas vezes a concentração recomendada pelo fabricante. Todos os procedimentos de lavagem e desinfecção de alfaces, artificialmente contaminadas com *E. coli* O157:H7, reduziram as contagens em $2,97 \pm 1,21 \log \text{UFC/g}$, apenas o tratamento conduzido a 10°C, diferiu significativamente dos demais, apresentando maior redução $6,27 \pm 0,50 \log \text{UFC/g}$. Esses resultados demonstram que as cepas de *E. coli* O157:H7 foram resistentes a diferentes situações de estresse, sendo portanto importantes do ponto de vista epidemiológico, visto que estão presentes no sul do Brasil e podem se tornar agentes etiológicos de surtos alimentares.

Palavras- chave: *E. coli* O157:H7, resistência térmica, resistência ácida, desinfecção

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Microbiologia de Alimentos Processados e "in Natura", Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (123 p.) Março, 2014.

AValiação DA RESISTÊNCIA TéRMICA, ÁCIDA E A DESINFETANTES DE CEPAS DE *Escherichia coli* O157:H7 ISOLADAS NO SUL DO BRASIL

Autor(a): Cheila Minéia Daniel de Paula

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

²ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is a major food pathogens today, and recently, several strains of this organism were isolated in southern Brazil. The objective of this study was to characterize two strains of *E. coli* O157: H7, by evaluating its thermal and acid resistance and behavior among different disinfectants and cleaning procedures on leafy vegetables. The results showed a significant reduction in bacterial counts after 3 minutes at 60 ° C, 2 min at 65 ° and 1 min at 70, 72 ° C and 75 ° C. However, after acid adaptation, none of the strains was inactivated at 60 ° C among 3 minutes. At 70 ° C significant increase in heat resistance was observed only for CC. Regarding acid resistance, both strains survived when exposed to TSBm medium at different pH adjusted from 2.0 to 9.5 with hydrochloric acid and propionic acid (PA). Only when the medium was adjusted with AP at pH 2.0 it was able to significantly reduce the counts of both strains. Evaluating the resistance to disinfectants, Ethyl Alcohol Free (96°GI and 70 %) and quaternary ammonium were able to inactivate both strains, even in the presence of organic matter. For the organic acid in the concentration recommended by the manufacturer and at the double concentration there was reduced around 90 % of the counts after 5 minutes of exposure. The sodium dichloroisocyanurate only showed significant reductions when used in the double concentration recommended by the manufacturer. All procedures for cleaning and disinfecting the lettuces artificially contaminated with *E. coli* O157 : H7 counts decreased by 2.97 ± 1.21 log CFU / g , only the treatment conducted at 10 ° C reduced significantly from the others ($6, 27 \pm 0.50$ log CFU / g). The results demonstrate that the strains of *E. coli* O157 : H7 were resistant to different stress situations and therefore are important as an epidemiological point of view, as it is present in southern Brazil and can become etiologic agents of food borne outbreaks.

Keywords: *E. coli* O157: H7, thermal resistance, acid resistance, disinfection

² Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (123 p.) March, 2014

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	
xi	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características gerais das <i>Escherichia coli</i> e <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas.....	4
2.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ou ETEC	5
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	6
2.2.2. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EA _g EC).....	7
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivas (EIEC)	7
2.2.4. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	8
2.3. <i>Escherichia coli</i> O157: H7	9
2.3.1. Características gerais.....	9
2.3.2. Fatores de virulência de <i>E. coli</i> O157:H7	10
2.4. Características das Doenças causadas por <i>E. coli</i> O157:H7	15
2.5. Reservatórios e fontes de contaminação	20
2.6. Surtos por <i>E. coli</i> O157:H7	21
2.7. Isolamentos de <i>E. coli</i> O157:H7 no Brasil.....	23
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Culturas microbianas	29
4.2. Recuperação das culturas microbianas	30
4.3. Preparo do Inóculo	30
4.4. Procedimentos de análise	31
4.4.1. Resistência térmica de cepas de <i>E. coli</i> O157:H7.....	31
4.4.2. Avaliação da resistência ácida de <i>E. coli</i> O157:H7	32
4.4.3. Avaliação da redução de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a diferentes desinfetantes.....	34
4.4.3.1. Avaliação da resistência aos desinfetantes.....	34
4.4.4. Avaliação dos processos de lavagem e desinfecção de alfaces artificialmente contaminadas com <i>Escherichia coli</i> O157:H7	36
4.4.4.1. Preparo do inóculo	36
4.4.4.2. Aquisição e preparo da alface.....	36
4.4.4.3. Contaminação artificial da alface	37
4.4.4.4. Tratamento da alface artificialmente contaminada.....	37

4.4.4.5.	Avaliação dos Tratamentos.....	39
4.4.4.6.	Cálculo da redução microbiana para análise estatística	40
4.5.	Análise estatística.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1.	Avaliação da resistência térmica de cepas de <i>E. coli</i> O157:H7	42
5.2.	Avaliação da resistência ácida de <i>E. coli</i> O157:H7	51
5.2.1.	Resistência de <i>E. coli</i> O157:H7 frente a diferentes desinfetantes	60
5.2.2.	Avaliação dos processos de lavagem e desinfecção de alfaces contaminadas com <i>Escherichia coli</i> O157:H7	67
6.	CONCLUSÕES.....	78
7.	REFERÊNCIAS.....	81
8.	ANEXOS.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos tratamentos utilizados na avaliação da resistência ácida de cepas de <i>E. coli</i>	33
Tabela 2. Descrição dos tratamentos utilizados na avaliação da higienização de alfaces artificialmente contaminadas com <i>E. coli</i> O157:H7(CC).....	38
Tabela 3. Reduções médias das contagens e desvio padrão após avaliação da resistência térmica em diferentes condições de tempo e temperatura de três cepas de <i>E. coli</i>	42
Tabela 4. Reduções médias das contagens e desvio padrão após avaliação da resistência térmica em diferentes condições de tempo e temperatura de três cepas de <i>E. coli</i> ácido adaptadas (AD).....	44
Tabela 5. Reduções logarítmicas e desvio padrão obtidos após avaliação da resistência ácida de três cepas de <i>E. coli</i> em meio acidificado com ÁCIDO CLORÍDRICO em diferentes condições de tempo e pH.....	51
Tabela 6. Reduções logarítmicas e desvio padrão obtidos após avaliação da resistência ácida de três cepas de <i>E. coli</i> em meio acidificado com ÁCIDO PROPIÔNICO em diferentes condições de tempo e pH.....	52
Tabela 7. Reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> O157:H7 A13P3 frente ao dicloroisocianurato (desinfetante A) em diferentes concentrações.....	61
Tabela 8. Médias das reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> ATCC8739 frente ao dicloroisocianurato (desinfetante A) em diferentes concentrações.....	62
Tabela 9. Reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> O157:H7A13P3 frente ao ácido orgânico (desinfetante B) em diferentes concentrações em função do tempo.....	63
Tabela 10. Reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> ATCC8739 frente ao ácido orgânico (desinfetante B) em diferentes concentrações em função do tempo.....	63
Tabela 11. Reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> ATCC8739 frente ao álcool etílico em diferentes concentrações em função do tempo.....	65
Tabela 12. Médias das reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> O157A 13P3 frente ao cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações em função do tempo.....	66
Tabela 13. Médias das reduções logarítmicas da <i>E. coli</i> ATCC8739 frente ao cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações em função do tempo.....	66
Tabela 14: Valores médios e desvio padrão das reduções de mesófilos e <i>E. coli</i> O157:H7, em alface artificialmente contaminada, submetida a diferentes tratamentos.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. .eduções médias das contagens de Mesófilos totais e *Escherichia coli* O157:H7 (CC) em alface artificialmente contaminada submetida a diferentes tratamentos.....

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AD - ácido adaptadas
AIH - Autorização de Internação Hospitalar
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP - ácido propiônico
CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CH - Colite Hemorrágica
CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica
DATASUS - Departamento de Informática do SUS
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos
E. - *Escherichia*
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EEC - *Escherichia coli* patogênicas
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasivas
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
espP - serina protease extracelular
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
etp - sistema de secreção tipo II
EUA - Estados Unidos da América
FDA - Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Drogas)
HCl - ácido clorídrico
hlyA - enterohemolisina
IAL - Instituto Adolf Lutz
ICTA - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IRC - insuficiência renal crônica
katP – catalase peroxidase
LEE - local de desaparecimento do enterócito
LT - termo-lábil
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS - Ministério da Saúde
MUG - 4-metilumbiferil- β -D-glicuronídeo
NaOH - Hidróxido de Sódio
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PFGE - pulsed field gel electrophoresis (Eletroforese em campo pulsante)
PTT - Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RNA - Ácido Ribonucleico
RS - Rio Grande do Sul
SES - Secretaria de Estado da Saúde

SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica
SMAC - Ágar MacConkey Sorbitol
SP - São Paulo
ST - estável ao calor
STEC - *E. coli* produtoras de toxina Shiga
Stx - Toxinas Shiga
SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária
TSBm - Modified Tryptone Soy Broth (Caldo Triptona de Soja Modificado)
TTP - Trombocitopenia Trombótica Púrpura
TTSS - reguladores transcricionais do sistema de secreção tipo III
UFC - Unidades Formadoras de Colonias
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV - Ultravioleta
VTEC - *E. coli* verotoxigênicas
ppm - partes por milhão

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, *Escherichia coli* O157:H7 vem ganhando notoriedade mundial, devido ao seu envolvimento com graves surtos alimentares, ocorridos em diversos países (GRIFFIN et al, 2002; LANIER et al, 2011; ATEBA & MBEWE, 2011; SCALLAN et al, 2011, CDC, 2012). Devido a sua alta severidade e baixa dose infectante, esse microrganismo tem sido considerado uns dos principais patógenos alimentares da atualidade, em nível mundial (ETCHEVERRÍA & PADOLA, 2013; FARROKH et al, 2013). Dentre as síndromes causadas pela *E. coli* O157:H7 destacam-se a colite hemorrágica (CH) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a qual pode levar à morte (AZAGRA & INGLESÍAS, 2009). Considerando a rápida dispersão da *E. coli* O157:H7 em nível mundial, é evidente a necessidade de avaliar criticamente o potencial patogênico e as características dessas bactérias em seus locais de ocorrência.

No Brasil *E. coli* O157:H7 ainda não é considerada endêmica, como é o caso da Argentina (RIVAS et al, 2006). Em território nacional ainda são poucos os relatos de isolamento desse microrganismo, sendo que a bibliografia especializada relatou apenas um único caso de envolvimento desse microrganismo em um surto alimentar (SVS-SP, 2011). Por outro lado, diversos relatos de casos clínicos de SHU já foram publicados no Brasil, sugerindo que esse microrganismo já esteja em território nacional há algum tempo, porém

sem ter sido identificado, uma vez que seu isolamento depende da utilização de métodos que não são aplicados na rotina dos laboratórios de análise de alimentos, no Brasil (GUTH et al, 2002; IRINO et al., 2002; VAZ et al, 2004; NISHIMURA et al, 2005; CVE/SP, 2011; SOUZA et al, 2011; SVS-SP, 2011).

Dada a importância desse patógeno em saúde pública, a investigação da *E. coli* O157:H7 em amostras de alimentos assume grande relevância, principalmente em países com forte produção de carne e vegetais, uma vez que esse patógeno tem sido frequentemente associado ao consumo de carne e vegetais frescos (FENG et al, 2011; MCKELLAR & DELASQUIS, 2011; CDC, 2012; OLIVEIRA et al, 2012).

Em 2012, o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) isolou *E. coli* O157:H7 a partir de duas amostras de água de enxague de alfaces, em uma pequena propriedade de produção orgânica, no sul do Brasil (RODRIGUES et al, 2014). No mesmo período, outro estudo realizado no mesmo Laboratório (LOIKO, 2013), isolou 22 cepas de *E. coli* O157:H7 em carcaças de bovinos de um abatedouro frigorífico, em outra cidade do sul do Brasil. As cepas de ambos estudos foram comparadas e os resultados demonstraram que todas elas foram verotoxigênicas, apresentam diferentes perfis de resistência a antimicrobianos e vários padrões de bandas após análises moleculares, demonstrando que diferentes cepas de *E. coli* O157:H7 estavam, e provavelmente ainda estão presentes, no sul do Brasil. Em vista disso, o presente estudo tem o objetivo avaliar a sobrevivência de cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas no sul do Brasil frente a diferentes

temperaturas, pH e desinfetantes a fim de aprofundar o conhecimento sobre as cepas isoladas no sul do Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais das *Escherichia coli* e *Escherichia coli* enteropatogênicas

Escherichia coli pertence ao grande e diversificado grupo de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, assim como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. São bastonetes gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácidos e gás em caldo EC (*Escherichia coli*), em 24 horas a 44,5° C (JAY, 2005; FENG et al, 2011). Em sua maioria, *E. coli* não causam doenças e fazem parte da flora normal do trato intestinal dos animais, incluindo os humanos (OLSEN et al, 2000; MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006; FENG et al., 2011, TCHAPTCHET & HANSEN, 2011). Esses microrganismos são frequentemente utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos (BRASIL, 2011; OLANIRAN et al, 2011) e também são utilizados como indicadores de falhas de higiênico-sanitárias (JAY, 2005).

Diversos clones de *E. coli* foram adquirindo fatores de virulência que lhes permitiram adaptar-se a novos ambientes e, em alguns casos, causar doenças graves (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; FARROKH et al, 2013). Atualmente, com base nos sintomas das doenças e nas características sorológicas é possível dividir os mais de 150 sorovares de *E. coli* conhecidos em seis grupos de *E. coli* patogênicas (EEC). As EEC que causam

gastroenterites em humanos são divididas nos seguintes grupos: as enteropatogênicas, as enterotoxigênicas, as enteroinvasivas, as enterohemorrágicas, as enteroagregativas e as difuso-aderentes (SAUCEDO et al, 2003; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; GUTH et al, 2010; FENG et al, 2011, FARROKH et al, 2013).

Enquanto alguns tipos de *E. coli* causam diarreia, outras causam infecções urinárias, doenças respiratórias e pneumonia e outras doenças (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007). Outras, no entanto, podem causar doenças graves transmitidas por alimentos como é o caso da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que produz uma toxina denominada Shiga, sendo conhecidas como *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; FENG et al, 2011). Cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga estão envolvidas em um amplo espectro de doenças. No grupo das EHEC, *E. coli* O157:H7 é o sorovar de maior importância e o mais estudado (FARROKH et al, 2013).

2.2. *Escherichia coli* enterotoxigênica ou ETEC

Escherichia coli enterotoxigênica, ou ETEC, é uma importante causa de doença diarreica bacteriana. Cepas de *E. coli* enterotoxigênica são reconhecidas como um agente causador da “diarreia dos viajantes”. Doença é caracterizada por diarreia aquosa com pouca ou nenhuma febre. Infecções por ETEC ocorrem comumente em países em desenvolvimento, especialmente entre crianças. ETEC é transmitida por alimentos ou água contaminada com fezes humanas ou animais (FENG et al, 2011; FORSYTHE, 2013). Embora

ETEC cause uma quantidade significativa de casos, a infecção é auto-limitante e raramente é fatal.

A patologia da ETEC se dá devido as suas enterotoxinas. ETEC pode produzir uma enterotoxina termo-lábil (LT), que é muito semelhante em tamanho (86 kDa), sequência, antigenicidade e função para toxina da cólera e uma toxina estável ao calor (ST), que é de tamanho molecular baixo (4 kDa) e resistentes à ebulição durante 30 min. Existem diversas variantes de ST, dos quais ST1A (ou STP) é encontrado em *E. coli* isoladas a partir de seres humanos e animais, enquanto ST1b ou STH é predominante em isolada de humanos (FENG et al, 2011).

As ETEC colonizam as proximidades do intestino delgado, se multiplicam e produzem a toxina. A dose infectante para adultos foi estimada em 10^8 a 10^{10} células, no entanto, crianças, idosos e imunodeprimidos podem ser susceptíveis a níveis menores (MORENO et al, 2008). Devido à sua elevada dose infectante, a análise da presença ETEC geralmente é realizada quando níveis elevados de *E. coli* são encontrados em um alimento (FORSYTHE, 203; SENAI-SP, 2007).

2.2.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Cepas de EPEC geralmente não são produtoras de enterotoxinas, contudo, podem causar diarreia. Possuem um plasmídeo com um fator de aderência que possibilita à adesão a mucosa intestinal. Após a colonização do intestino são produzidas lesões do tipo “ligação e desaparecimento” (A/E). O fenômeno A/E parece ser o fator de virulência mais importante de cepas de EPEC. A dose infectante fica por volta de 10^7 células e a doença pode durar

alguns dias em crianças geralmente com menos de um ano de idade (FORSYTHE, 2013; FENG et al, 2011).

2.2.2. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

As cepas de EAEC causam diarreia aquosa persistente, principalmente em crianças, com duração de mais de 14 dias. Imagina-se que a EAEC possam aderir à mucosa intestinal e elaborar enterotoxinas e citotoxinas, as quais resultam em diarreia secretória e em danos na mucosa, além disso, exibem a capacidade de aderência a células intestinais conhecida como “empilhamento de tijolos”. (FORSYTHE, 2013; FENG et al, 2011).

2.2.3. *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC)

As *E. coli* enteroinvasivas geralmente não produzem enterotoxinas, são muito semelhantes bioquímica e sorologicamente com a *Shigella*. Como *Shigella*, não existem reservatórios animais conhecidos, daí a fonte primária para EIEC parecem ser seres humanos infectados. Embora a dose infectante de *Shigella* seja baixa, por volta de 10 a algumas centenas de células, estudos demonstraram que a dose infectante da EIEC geralmente é de 10^6 a 10^8 células, sendo que o período de incubação da doença pode variar de 2 a 48 horas com média de 18 horas (FORSYTHE, 2013; FENG et al, 2011).

Ao contrário de *E. coli* típicas, EIEC são imóveis, não descarboxilizam a lisina e não fermentam lactose. A patogenicidade de EIEC se deve principalmente devido a sua capacidade de invadir e destruir o tecido do cólon. O microrganismo contém um plasmídeo de elevado peso molecular necessário para invasão, o fenótipo invasão, pode ser detectado por ensaios

de invasão usando cultura de tecidos HeLa ou Hep-2 ou por PCR e sondas específicas para genes invasão (FORSYTHE, 2013; FENG et al, 2011).

2.2.4. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

As EHEC ou *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) compõem um importante grupo de patógenos emergentes transmitidos por alimentos nos últimos anos (BEUTIN et al, 2002; BLANCO et al, 2004; Gomes et al, 2010; Panciola et al, 2014). As STEC são também chamadas de *E. coli* verotoxigênicas ou produtoras de verotoxinas (VTEC). As toxinas Shiga são o principal fator de virulência das STEC (CALDERWOOD et al, 1996). Estas possuem estrutura com duas subunidades (A e B) e são codificadas por bacteriófagos inseridos no cromossomo bacteriano. A subunidade A é a parte biologicamente ativa e a B a subunidade necessária para a ligação ao receptor celular específico chamado Globotriaosil ceramida (Gb3) (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007). As toxinas Shiga são citotoxinas de origem proteica designadas como Stx1 e Stx2, de acordo com seus efeitos citotóxicos em células Vero ou Hela (PATON & PATON, 1998).

Mais de 400 sorovares de STEC foram isolados de bovinos saudáveis (BLANCO et al, 2004), porém, *E. coli* EHEC têm sido frequentemente implicadas em doenças humanas severas (NATARO & KAPER, 1998). Embora não haja um consenso sobre isso, geralmente, *E. coli* isoladas de alimentos e produtoras de toxina Shiga são chamadas de STEC, enquanto que aquelas STEC isoladas de pessoas com diarreia hemorrágica têm sido chamadas de EHEC (FORSYTHE, 2013; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; FENG et al, 2011).

Cepas de EHEC afetam somente o intestino grosso (cólon) e produzem grandes quantidades de toxinas Shiga. Cepas de EHEC contêm um plasmídeo de 60 MDa, o qual codifica as fímbrias denominadas de enterohemolisinas, e é encontrado em cepas de *E. coli* O157:H7 e não O157. A capacidade de produzir lesão do tipo “Ligação-Desaparecimento” requer a proteína intimina (codificada pelo gene cromossomal *eae*) (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007).

Os sorovares de *E. coli* O157:H7 são mais frequentemente associados a surtos infecciosos. Isso sugere que essas cepas são mais patogênicas ou mais transmissíveis do que as outras (FORSYTHE, 2013). Mesmo assim, cepas de *E. coli* não O157 também têm sido comumente associadas a doenças humanas, principalmente os sorovares O26: H11, O103:H2, O111:NM e O113:H21 (KARMALI et al, 2004). Os sorogrupos de *E. coli* O26, O111, O103 são os sorogrupos não-O157 que mais causam doenças em pessoas, nos Estados Unidos (CDC, 2012).

2.3. *Escherichia coli* O157: H7

2.3.1. *Características gerais*

As cepas do sorovar O157:H7 apresentam a maioria das características bioquímicas típicas da espécie *E. coli*, ou seja: são indol positivo, VM positivo, VP negativo, citrato negativo, H₂S negativo e urease negativo (BRENNER et al, 2005). Contudo, diversas características desse sorovar são diferentes de outras *E. coli*, como por exemplo, a multiplicação pobre ou nula a 44° C (ela se multiplica em caldo EC no máximo até 42° C) a incapacidade de utilizar o sorbitol em 24 horas e a inabilidade de produzir

β -glicuronidase, uma enzima capaz de hidrolisar o 4-metilumbiferil- β -D-glicuronídeo (MUG), fornecendo um produto fluorescente, detectável sob luz UV. Além disso, elas toleram quantidades menores de sais biliares que a maioria das *E. coli* (MENG & DOYLE, 1998; FORSYTHE, 2013; JAY, 2005).

2.3.2. Fatores de virulência de *E. coli* O157:H7

Os mecanismos pelos quais *E. coli* O157:H7 causam CH e SHU ainda não foram totalmente elucidados (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007), no entanto o principal fator de virulência das EHEC, dentre elas a O157:H7, é a produção das toxinas Shiga like (Stx), extremamente potentes e responsáveis por muitos dos sintomas observados nos pacientes infectados (NATARO & KAPER, 1998, GUTH et al, 2006).

A capacidade de produzir toxinas Shiga é o principal fator de virulência das EHEC para o desenvolvimento de SHU, uma vez que as toxinas são os principais fatores na patogênese da lesão endotelial microvascular que ocorre na SHU (AZAGRA & INGLESIAS, 2009; FERNANDEZ-BRANDO et al, 2011). Supõe-se que as *E. coli* O157:H7 tenham evoluído a partir da EPEC e adquirido os genes para produção de toxinas da *Sh. dysenteriae* por meio de um bacteriófago (COGLAN, 1998). *E. coli* após ser infectada pelo vírus que inseriu seu DNA no cromossomo da bactéria, a qual passou a conter a informação necessária para a produção de toxinas Shiga (AZAGRA & INGLESIAS, 2009).

A toxina Shiga apresenta dois grupos principais imunologicamente distintos e não passíveis de reações cruzadas, chamados de Stx1 e Stx2 (ou

VT1 e VT2). Uma cepa EHEC pode expressar apenas a Stx1, apenas a Stx2, ambas ou múltiplas formas da Stx2 (EDUARDO, 2002; GUTH et al, 2006).

Toxinas Shiga ou Shigatoxinas são assim denominadas devido a sua similaridade com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1. Inicialmente esses fatores citotóxicos foram chamados de Verotoxinas, devido ao seu efeito citotóxico a células Vero de rim de macaco verde africano (DOLYLE, 1995; FENG, 1995; MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006).

Dados epidemiológicos sugerem que a Stx2 é mais importante no desenvolvimento de SHU do que a Stx1 (AZAGRA & INGLESIAS, 2009). Vários relatos indicam que as cepas de *E. coli* O157:H7 que expressam apenas a Stx2 têm maior probabilidade de provocar SHU do que as que expressam apenas a Stx1 ou, curiosamente, ambas (ZHANG et al, 2007; FERNANDEZ-BRANDO et al, 2011).

O grupo Stx1 é bastante homogêneo, e até o momento foi identificado somente a variante Stx1c associada principalmente a ovinos (ZHANG et al., 2002), porém esta variante também foi detectada em combinação com Stx2d em isolados de origem clínica e de casos menos severos de diarreia (BEUTIN et al, 2004).

As toxinas Shiga pertencem ao grupo das toxinas tipo A/B, isto é, apresentam uma subunidade do tipo A, que é enzimática, e 5 subunidades do tipo B, que são oligômeros constituídos de 5 proteínas idênticas (SCHMITT et al, 1999) responsáveis pela ligação da toxina às células hospedeiras. O receptor principal para Stx1 e Stx2, identificados nos humanos, é a globotriaosil ceramida ou receptor *Gb3*, e sua expressão na superfície da célula alvo está

ligada à citotoxicidade (JACEWICZ et al, 1995). Nos humanos esses receptores estão presentes principalmente nas células epiteliais do intestino, nas células do endotélio vascular e nas células do epitélio renal (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Essa estrutura básica A/B é comum a todas as toxinas Shiga e a Stx1 da EHEC é praticamente idêntica à Stx da *S. dysenteriae* I, diferenciando-se da mesma apenas em um aminoácido (AZAGRA & INGLESIAS, 2009). As toxinas Stx1 e Stx2 da EHEC apresentam 55% de homologia na sequência da subunidade A e 57% na sequência da subunidade B (JACKSON et al, 1987).

A subunidade A é responsável pela ação biológica da toxina que clivará o RNA ribossomal, impedindo a síntese proteica na célula do hospedeiro (QUINTANILLA, 2005). As subunidades B mediam a ligação da toxina à célula hospedeira, através de receptores específicos (NATARO & KAPER, 1998).

Após a entrada da bactéria através da via oral a resistência ácida demonstrada pela *E. coli* O157:H7 possibilitará sua sobrevivência na passagem pelo estômago, permitindo que a mesma chegue ao intestino delgado e posteriormente até o cólon, considerado o principal local de colonização em humanos (PATON & PATON, 1998, FERNANDEZ-BRANDO et al, 2011). A partir daí as células se aderem a superfícies mucosas e produzem um ou mais tipo de Shiga toxinas.

As Stxs são produzidas pelas bactérias no cólon e chegam até os rins pela corrente sanguínea, danificando as células renais e produzindo uma oclusão da microvasculatura através da combinação da toxicidade e indução

da produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em uma inflamação local, podendo conduzir a SHU (QUINTANILLA, 2005; ANDREOLI et al, 2002). A Stx também induz apoptose do enterócito (QUINTANILLA, 2005).

O dano às células endoteliais do rim, por meio deste processo, é provavelmente o primeiro evento da SHU. Esse processo pode afetar outros órgãos incluindo o cérebro, miocárdio e pâncreas, com o consequente desenvolvimento de encefalopatia, cardiomiopatia e diabetes mellitus (COIA, 1998).

As cepas EHEC são capazes de aderir fortemente às células epiteliais, através da produção de uma proteína de superfície/membrana denominada intimina de 94kDa, codificada por genes do DNA cromossomal, e de um receptor – *Tir* - que, uma vez secretado na célula hospedeira, aloja-se na membrana e serve como ponto de ancoragem para a intimina (BASSLER et al, 1995; COMO-SABETTI et al, 1997; FAITH et al, 1996). A intimina é responsável pela união da bactéria ao enterócito e pela desorganização das microvilosidades com produção da lesão A/E (*attaching and effacing*). A formação da lesão A/E está associada com drástico desordenamento do citoesqueleto da célula do hospedeiro, resultando na produção de uma estrutura com forma de pedestal, rica em actina polimerizada (SALYERS & WHITT, 1994; NATARO & KAPER, 1998; JAY, 2005; CRISTANCHO et al, 2008).

A intimina e o receptor *Tir* são codificados pelos genes *eae* e *tir*, respectivamente, presentes numa região do DNA chamada LEE ("*locus of enterocyte effacement*") (ALEXANDER et al, 1995). A sequência de

aminoácidos das intiminas produzidas pelas diferentes cepas EHEC são altamente divergentes na extremidade carboxílica e, com base nessas variações, são classificadas em 5 subgrupos (α , β , γ , δ , e ϵ). Na *E. coli* O157:H7 ocorre o tipo γ (GARBER et al, 1995). Existe uma forte associação entre a produção da intimina e a ocorrência de colite hemorrágica e SHU (PATON & PATON, 1998). Diversos estudos mostram que gene *eae* é muito comum dentre as cepas isoladas de pacientes com essas doenças, mas dentre as cepas isoladas de reservatórios animais, só é frequente nos sorovares reconhecidos como patogênicos (BARRETT et al, 1992; BEUTIN et al, 1995; SANDHU et al, 1996).

As cepas de *E. coli* O157:H7 e a maioria dos demais sorovares da STEC isoladas de humanos apresentam um plasmídeo altamente conservado, chamado pO157 (BEUTIN et al, 1994). Também relatado na literatura como plasmídeo 60 MDa (PATON & PATON, 1998; RIVAS et al, 2000). O plasmídeo pO157 contém diversos genes que codificam os seguintes fatores de virulência: *espP* (serina protease extracelular), *katP* (catalase/peroxidase), *hlyA* (enterohemolisina) (SCHMIDT et al, 1995), *etp* (sistema de secreção tipo II) (KAPER et al, 1998; SCHMIDT et al, 2000). O gene *ehxA* (ou *hlyA*), que codifica uma hemolisina, chamada de enterohemolisina ou hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (*EHEC Hly*), cujo papel ainda é objeto de especulação, podendo estar associado à lise de eritrócitos “*in vivo*”, liberando heme e hemoglobina (RIVAS et al, 2000). Isso estimularia o crescimento da cepa O157:H7, porque essas cepas apresentam um sistema de transporte de ferro

altamente especializado, que permite utilizar heme e hemoglobina como fonte de ferro (TORRES & PAYNE, 1997).

Os genes responsáveis pela codificação das toxinas Shiga, chamados *stx1* e *stx2*, são usados como marcadores em métodos moleculares de detecção ou confirmação das cepas STEC (NATARO & KAPER, 1998; PATON & PATON, 1998; MORELLI, 2008). O gene *fliCH7* também tem sido investigado como fator de virulência das STEC, e ele codifica o antígeno flagelar de *E. coli* O157:H7 (GANNON et al, 1997).

Uma vez que essa bactéria não é identificada através de técnicas microbiológicas convencionais (PIGATTO et al, 2009), estudos recentes têm mostrado que abordagens alternativas para a detecção e de confirmação de *E. coli* O157:H7 combinando PCR com enriquecimento seletivo e procedimentos de separação imunomagnética melhoram a sensibilidade de detecção e especificidade (SHAH et al, 2009; GORDILLO et al, 2011). Vários procedimentos de PCR- multiplex foram desenvolvidos para detectar diferentes combinações dos principais genes de virulência em *E. coli* O157: H7, como *fliC*, *stx1*, *stx2*, *eeeA*, *rfbE*, *uidA* e *hlyA* (SHAH et al, 2009; BAI et al, 2010; FRATAMICO & DEBROY, 2010; JACOB et al, 2012).

2.4. Características das Doenças causadas por *E. coli* O157:H7

As doenças transmitidas pela *E. coli* O157:H7 podem resultar desde moderadas infecções até severas doenças resultando em morte e podem ser expressas por três manifestações diferentes: Colite Hemorrágica (CH),

Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), e Trombocitopenia Trombótica Púrpura (TTP) (GIANANTONIO et al, 1964; BOYCE et al, 1995; RIVAS et al, 2008).

A CH é uma forma de infecção menos grave caracterizada por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta. O período de incubação normalmente é de 3 a 4 dias, podendo variar de 5 a 8 dias ou ser bastante curto como 1 a 2 dias, em alguns casos. A reclamação inicial normalmente é diarreia precedida de dor abdominal e febre baixa em muitos pacientes. Vômitos acontecem na metade dos pacientes durante o período de diarreia sem sangue e/ou em outros tempos. Dentro de um ou dois dias, a diarreia fica sanguinolenta e aumentam as dores abdominais. Esta dor abdominal é descrita como de igual intensidade com a "dor do parto" e pior que as dores de apendicite. Esta fase normalmente dura de 4 a 10 dias. Nos casos mais sérios, amostras fecais são descritas como "*All blood and no stool*" (somente sangue sem fezes). Pode ocorrer vômito, com pouca ou nenhuma febre (PADHYE & DOYLE, 1992; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007; CVE/CCD/SES-SP, 2011).

A CH pode ser diagnosticada pelo isolamento da *E. coli* O157:H7 ou shigatoxinas produzidas pela *E. coli* a partir de amostras fecais de pacientes com diarreia sanguinolenta. A confirmação também pode ser obtida através do isolamento deste sorovar em alimentos incriminados (FDA, 2014). Na maioria dos pacientes, a diarreia sanguinolenta termina sem sequelas, mas em alguns casos a doença progride para SHU e complicações subsequentes (COPPO, 2005; CVE/CCD/SES-SP, 2011).

Aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7, especialmente em crianças menores de 5 anos e idosos, podem progredir para a SHU caracterizada pela destruição das células vermelhas do sangue e falência renal, a qual pode ser acompanhada de deterioração neurológica e insuficiência renal crônica (EDUARDO et al, 2002, SÁNCHEZ et al, 2010, FERNANDEZ-BRANDO et al, 2011).

Embora a SHU possa ser determinada por outros patógenos como *S. dysenteriae*, em algumas regiões tropicais casos de SHU podem ser causados por *Citrobacter freundii*. Contudo, em 85% dos casos, a doença ocorre depois de um episódio de gastroenterite causada por *E. coli* produtora de shigatoxina (GEARY, 2007; AZAGRA & IGLESIAS, 2009). Segundo Azagra & Inglesias (2009) a SHU é a causa de 4,5% dos casos de crianças com insuficiência renal crônica (IRC) em pediatria submetidas a tratamentos com a terapia de transplante de rins.

Estima-se a ocorrência de 73.000 casos de infecção, 2.100 hospitalizações e 61 casos fatais (letalidade de 3% a 5%), anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2009). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, há vários anos a SHU tem sido a causa mais comum de insuficiência renal em crianças na Argentina, onde cerca de 250 novos casos são relatados anualmente (WHO, 1997). Na Argentina a SHU é uma doença endêmica, tendo um dos índices globais mais altos, aproximadamente, 10,4 e 12,2/100.000 casos em crianças em 2000 e 2001, respectivamente (RIVAS et al, 2006).

No Brasil, existem relatos de ocorrência de SHU, porém não há dados sistemáticos que possam indicar a situação da síndrome (SOUZA et al,

2011). No Estado de São Paulo, um estudo vem sendo conduzido pelo CVE para determinar a situação dessa síndrome no Estado e para estabelecer um ponto de partida para a introdução do sistema de vigilância da bactéria e da SHU (DDTHA/CVE, 2003).

Dentre as enfermidades causadas por *E. coli* O157:H7 a SHU é a complicação mais severa da infecção entérica (CRINNANTONIO et al, 1964 apud PADHYE & DOYLE, 1992; NATARO & KAPER, 1998; FORSYTHE, 2013). A SHU é diagnosticada em média 7+/- 2 dias após o estabelecimento da diarreia (CVE/CCD/SES-SP, 2011). Ela é definida pela tríade, anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. Esta síndrome ocorre quando os rins são afetados pela toxina Shiga (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006). Clinicamente, pacientes com SHU apresentam-se seriamente doentes ou algumas vezes com icterícia e, frequentemente, com hipertensão. Necessitam de hemodiálise com frequência e de transfusões de sangue. Os pacientes podem apresentar problemas no sistema cardiovascular e sistema nervoso central com infartos cardíacos, ataques repentinos de apoplexia e encefalopatias hipertensivas. A SHU pode levar à morte (CVE/CCD/SES-SP, 2011). A maioria dos pacientes recupera-se com terapias apropriadas, mas de 3 a 5% das crianças vão a óbito e aproximadamente 12 a 30% têm sequelas severas que incluem falha renal grave, hipertensão e/ou manifestações no sistema nervoso central (NATARO & KAPER, 1998; FORSYTHE, 2013).

Como não há uma terapia específica para a SHU a base do tratamento para pacientes com SHU é terapia de suporte, o que geralmente

inclui: controle fluidos e eletrólitos, controle da pressão arterial e uso de diálise e transfusão de sangue, de acordo com o estado a função renal e o grau de anemia em casos mais extremos transplante de rins (USDA, 1994; WEAGANT et al, 1995; EDUARDO et al, 2002, FERNANDEZ- BRANDO et al, 2011).

Em relação ao tratamento com antibióticos, a análise de um surto *E. coli* O157:H7, no Japão havia sugerido que a utilização de fosfomicina impediria o risco de progressão para SHU, no entanto vários estudos demonstraram que crianças com colite hemorrágica, que são tratadas com antibióticos estão mais propensas a evoluir para casos mais graves ou SHU (IKEDA et al, 1999). Outro estudo no entanto confirmou que os antibióticos da família de lactâmicos e sulfa aumentam o risco de desenvolvimento de SHU crianças infectadas com *E. coli* O157:H7. (WONG et al, 2000). Segundo Fernandez-Brando et al (2011), não há consenso de antibioticoterapia é contraindicado em casos de suspeita ou confirmação de infecção por STEC e tratamentos alternativos tem sido estudado.

A infecção por *E. coli* O157:H7 também pode desencadear um quadro denominado Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). Pacientes com PTT exibem características clínicas e patológicas semelhantes à de pacientes com SHU, porém o envolvimento do sistema nervoso central é a principal característica. É uma síndrome que geralmente ocorre em adultos, e consiste de anemia hemolítica micro angiopática, trombocitopenia profunda, sinais neurológicos, febre e azotemia. Ocorre formação de coágulos sanguíneos, o que resulta frequentemente em morte (CVE/CCD/SES-SP, 2011). No Brasil a incidência não é conhecida (SOUZA et al, 2011).

2.5. Reservatórios e fontes de contaminação

Bovinos tem sido identificados como o principal reservatório de *E. coli* 0157:H7, uma vez que podem excretar o patógeno pelas fezes e assim contaminar alimentos, água e ambientes (LAEGREID et al, 1999; SHERE et al, 1998; CDC, 2009). A ingestão de leite cru contaminado devido à presença de fezes no úbere das vacas ou dos equipamentos de ordenha devido à contaminação cruzada também tem sido associada a surtos (FARROKH et al, 2013).

Entre outras fontes de infecção conhecidas estão os vegetais e frutas, provavelmente contaminados com fezes de gado durante a colheita ou no processamento. Já foram implicados na transmissão de *E. coli* O157:H7, vegetais como por exemplo, alface (ACKERS et al, 1998, CDC 2012), batatas (MORGAN et al, 1988), brotos de rabanete (WATANABE & OZASA, 1997) brotos de alfafa (CDC, 1997).

Existem ainda casos onde a transmissão se deu ao nadar ou beber água contaminada (não tratada) (PENNINGTON, 2010) e a transmissão pessoa a pessoa também é relatada, presumivelmente, através da via oral-fecal, se os hábitos de higiene ou lavagem de mãos não forem adequados e pelo contato direto com bovinos (BELL et al, 1994; RIVAS et al, 2008, AZASRA & INGLESIAS, 2009).

Embora a quantidade de microrganismos necessária para causar a doença não seja conhecida (dose infectante), suspeita-se que seja similar à da *Shigella* sp (10 células) (FENG et al, 2011; FORSYTHE, 2013).

2.6. Surtos por *E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 foi reconhecida como patógeno alimentar, pela primeira vez, nos estados de Oregon e Michigan, nos Estados Unidos, em 1982, causando dois surtos de diarreia sanguinolenta severa, envolvendo pelo menos 47 pessoas, após a ingestão de sanduíches contendo hambúrgueres de carne bovina, molho de cebola e pickles, distribuídos em uma rede de *fast food*. *E. coli* O157:H7 foi isolada de 9 das 12 diarreias de vítimas dos dois surtos e também de uma amostra de hambúrguer coletado em Michigan (RILEY et al, 1983). Segundo os mesmos autores, esse sorovar já tinha sido isolado de um caso clínico esporádico de CH, em 1975. Apesar da severidade dos sintomas, os surtos não foram amplamente divulgados na época.

Em 1991, outro surto, também nos Estados Unidos, dessa vez através do consumo de cidra de maçã não pasteurizada atingiu que 23 pessoas que consumiram a cidra aparentemente produzida a partir de com maçãs recolhidas do chão e contaminadas com esterco de ovinos (BESSER et al, 1993).

Em 1993, a *E. coli* O157:H7 foi responsável por um surto, envolvendo cerca de 700 pessoas, causando 4 mortes de crianças, devido ao consumo de hambúrgueres mal passados distribuídos por outra rede de *fast food*, dos Estados Unidos (CDC, 1993). A partir desse episódio, ganhou notoriedade e tem sido isolada de muitos alimentos envolvidos em muitos surtos, em diferentes países (MARLER, 2011). Em 1995, 92 pessoas foram atingidas por um surto em Montana, EUA, provocado pelo consumo de alface contaminada com água de irrigação (SILVA, 2004).

Em setembro de 2006, laboratórios oficiais do CDC foram alertados por epidemiologistas em Wisconsin e Oregon que o espinafre fresco era a fonte suspeita infecções por *E. coli* sorovar O157:H7 nesses estados, em seguida também foi relatada a ocorrência de *E. coli* O157:H7 infecções no Novo México associada ao consumo de espinafre fresco, outros estados também relataram casos. Após o estudo epidemiológico concluiu-se que as cepas de pacientes infectados em todos os estados envolvidos tinham correspondência. O surto acabou envolvendo um total de 183 casos de pessoas infectadas com *E. coli* O157: H7, relatados ao CDC a partir de 26 estados. Entre as pessoas doentes, 95 (52%) foram internadas, 29 (16%) desenvolveram SHU, e uma pessoa morreu (CDC, 2006).

Nos EUA, existe inclusive, um escritório de advocacia especializado que representa vítimas de toxinfecção alimentar causada por *E. coli* O157:H7 e outros microrganismos. Desde 1993, este escritório tem representado milhares de clientes em ações litigiosas contra restaurantes e indústrias de alimentos, no qual esses alimentos foram implicados como fonte de doenças (CLARK, 2008).

O maior surto, causado por *E. coli* O157:H7, registrado até hoje ocorreu no Japão, em Sakai, Osaka, em 1996. Brotos de rabanete branco servidos como parte do almoço de uma escola foram identificados como o veículo mais provável da infecção. Neste surto mais de 8.000 pessoas foram envolvidas, principalmente crianças. Um total de 106 crianças desenvolveram SHU, onde três delas morreram (MICHINO et al, 1998).

Na China, em 1999, um surto de *E. coli* O157:H7 causou 177 mortes devido à síndrome hemolítico-urêmica. Em estudo recente pesquisadores

investigaram propriedades genômicas e fenotípicas desse surto ocorrido e compararam com o genoma das cepas de *E. coli* do surto de 1996 em Sakai Japão e concluíram que os isolados estão intimamente relacionados filogeneticamente (XIONG et al, 2012).

Na Espanha, um estudo realizado entre os meses de janeiro de 2007 e dezembro de 2007 foram analisadas 1.675 amostras de coprocultura de pacientes com diarreia ou distúrbios intestinais, destas 8 (0,5%) foram positivas para *E. coli* O157:H7. A comparação do perfil molecular dessas amostras com o perfil de isolados de alimentos e animais de estudos anteriores, não demonstrou ligação, exceto por uma amostra de carne de javali abatido no período na mesma região de ocorrência dos casos clínicos. Ainda que não tenha sido possível identificar a fonte, uma vez que as amostras eram provenientes de quatro pacientes acometidos no período, esses dados indicaram o primeiro surto alimentar por *E. coli* O157:H7 da Cidade de Cáceres e o oitavo da Espanha, sugerindo uma possível relação da carne de javali com o surto (MARTÍNEZ, et al, 2009)

2.7. Isolamentos de *E. coli* O157:H7 no Brasil

No Brasil, não há dados sistemáticos sobre a *E. coli* O157:H7, nem sobre a SHU (EDUARDO, 2002; SILVA et al, 2003; SOUZA, et al, 2011). Somente casos esporádicos de diarreia e SHU associados com STEC têm sido relatados (CANTARELLI, et al, 2000; GUTH, et al, 2002, IRINO, et al, 2002, VAZ, et al, 2004; NISHIMURA, et al, 2005) e são poucos os registros de ocorrência de STEC em alimentos no Brasil (CERQUEIRA, et al, 1997; BERGAMINI, et al, 2004).

A primeira cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada no Brasil em 1997, de uma amostra de água de poço em uma chácara localizada em Parelheiros, São Paulo. (KATSUYA 1998). Também em São Paulo, foram caracterizadas três cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de fezes de pacientes, pelo Instituto Adolf Lutz (IAL). Uma das cepas foi isolada em 1990, de um paciente HIV positivo de 18 anos, enquanto as outras duas foram isoladas de uma criança com diarreia sanguinolenta e de um adulto com diarreia severa, respectivamente. As amostras foram sorotipificadas como O157:H7 e caracterizadas molecularmente como possuidoras dos fatores de virulência de EHEC, no entanto, não foi possível estabelecer relação com alimentos ou origem da infecção (IRINO et al, 2002).

O primeiro relato de isolamento de STEC de um paciente com SHU ocorreu em um hospital da cidade de São Paulo, no ano de 2001 (GUTH et al, 2002). Da avaliação de diagnósticos registrados pela AIH/DATASUS/MS, no período de 1998 a julho de 2000, no Estado de São Paulo, 12 casos foram de SHU, com histórico anterior de diarreia e de possível associação com a *E. coli* O157 (EDUARDO, 2002).

A ocorrência de *E. coli* O157:H7 foi avaliada em 886 amostras de hambúrgueres produzidos por oito fabricantes no sul e sudeste do Brasil entre janeiro e setembro de 1997. O agente patogênico não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, embora 17 (1,9%) tenham apresentado a presença de cepas de *E. coli*, e apresentavam aglutinação com antisoro O157, no entanto as mesmas não foram confirmadas em testes posteriores (Silveira et al, 1997). No ano seguinte 1998, *E. coli* O157:H7 foi isolada de amostras

coletadas em um matadouro no estado do Rio de Janeiro. Das três amostras identificadas (1,5%), uma foi de carne bovina e as outras duas de fezes de gado leiteiro. Este foi o primeiro relato de EHEC O157:H7 isolado de gado leiteiro no Brasil (CERQUEIRA, 1999).

Na Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, um estudo retrospectivo de casos de SHU ocorridos no Hospital Universitário, no período de março de 1987 a agosto de 1999 apontou a ocorrência de 25 casos da doença em crianças, com idade entre dois meses a 57 meses (BARCELOS et al, 2000).

Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo foram registrados no período de 1998 a 2006, 73 casos de SHU com possível associação com *E. coli* O157:H7 (CVE/SP, 2011). Recentemente, Souza et al (2011), analisando dados do centro de vigilância epidemiológica no Estado de São Paulo observaram baixa incidência de SHU entre crianças internadas em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica entre 1998 e 2007. Nesse período, foram identificados 13 casos de SHU relacionados com diarreia, destes, sete pacientes apresentaram altos níveis de anticorpos para O157 LPS, resultado que apoia fortemente evidência de infecção por *E. coli* O157 nestes pacientes.

Em outro estudo, foram analisadas as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais da síndrome hemolítico-urêmica (SHU) em Uberlândia, MG, para tanto, um estudo foi realizado abrangendo um período de dez anos de janeiro de 1994 a janeiro de 2004 no Departamento de Nefrologia Pediátrica em um hospital. Foram analisados fatores demográficos, fatores

desencadeantes, tempo de hospitalização, terapia de suporte e evolução doenças. Os resultados demonstram a possibilidade do diagnóstico SHU como uma causa de insuficiência renal na infância em ambas as formas típicas (pós-diarreia) e atípicas (BONETTI et al, 2011).

Em estudo mais recente, durante o período de um ano (1999-2000), Sandrini et al (2007) investigaram 60 propriedades leiteiras em Pelotas (RS), e comprovaram a presença de *E. coli* verotoxigênica em amostras de fezes de bovinos, de água ambiental, de água de consumo humano e de leite cru. Já na região de Ribeirão Preto - SP, pesquisadores caracterizaram os principais fatores de virulência de cepas de *E. coli* a partir de 473 cepas isoladas de amostras de água (19), leite (7) e fezes de bovinos leiteiros (466) de sete propriedades da região. Entre estas, duas amostras isoladas de bezerros foram positivas para *E. coli* O157:H7 e apresentaram o mesmo perfil genético pela técnica de PCR representado pela presença dos genes *stx1* e *eae* e foram consideradas potenciais cepas enterohemorrágicas (STELLA, 2009).

Recentemente, em um projeto com a Comunidade Europeia, o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos – ICTA/UFRGS isolou duas amostras de *E. coli* O157:H7 a partir de água de irrigação e água de lavagem de alfaces, também no sul do Brasil. A análise molecular por PFGE demonstrou similaridades de 80% ou mais entre cepas isoladas de carcaças bovinas e do ambiente (águas de lavagem e irrigação), sugerindo a ampla distribuição desse microrganismo, uma vez que eles foram isolados de municípios distintos e em cadeias produtivas distintas (RODRIGUES, et al, 2014).

No mesmo período, o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos – ICTA/UFRGS, em um projeto de pesquisa em parceria com outras Universidades Federais, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e demais Laboratórios brasileiros, isolou 22 amostras de *E. coli* O157:H7, coletadas entre os meses de outubro de 2011 e março de 2012, a partir de carcaças bovinas de um abatedouro frigorífico, no sul do Brasil (LOIKO, 2013).

Embora haja o registro desses isolamentos e de diversos casos de SHU no Brasil (CVE/SES-SP, 2010), a única implicação de *E. coli* O157:H7 veiculada por alimentos descrita na literatura é o caso de um surto com dois casos de diarreia, sem SHU, ocorrido em Campinas, em 2001, supostamente causado por ingestão de carne mal cozida. (CVE/SES-SP, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas no sul do Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resistência térmica de duas cepas de *E. coli* O157:H7, uma isolada de carcaça bovina e outra de água de lavagem de alfaces orgânicos, isoladas no sul do Brasil;
- Avaliar a resistência ácida das duas cepas de *E. coli* O157:H7 referidas acima;
- Avaliar a capacidade de sobrevivência de uma cepa de *E. coli* O157:H7 frente ao dicloroisocianurato de sódio, ácido orgânico, álcool etílico e quaternário de amônio;
- Avaliar a eficácia da redução de diferentes protocolos de limpeza e desinfecção de alface artificialmente contaminada com *E. coli* O157:H7.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Culturas microbianas

No presente estudo, duas cepas de *E.coli* O157:H7, isoladas pela primeira vez no Rio Grande do Sul foram utilizadas. Ambas as cepas foram caracterizadas por LOIKO (2012) através de testes tradicionais, bioquímicos e moleculares no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do ICTA/UFRGS e também pela Fundação Oswaldo Cruz. As cepas de *E. coli* O157:H7 foram identificadas no presente estudo como A13P3 e CC. As cepas CC e A13P3 apresentaram perfis moleculares caracterizados pela presença dos genes: *eae(+)*, *stx1(+)*, *stx2(+)*, *rfbO151(+)* e *stx2(+)*, *rfbO151(+)*, respectivamente, e apresentam similaridade de 80% segundo análise por PFGE-*Xba*I. Além disso, de acordo com o dendograma gerado pela análise PFGE-*Xba*I, a cepa CC de água de lavagem de alfaces possui 100% de similaridade com uma cepa de *E. coli* O157:H7 envolvida em surto alimentar na Argentina no ano de 2005 e mesmos genes conforme caracterização por PCR. As duas cepas quando submetidas ao teste de citotoxicidade para células vero apresentaram resultado positivo. Essas cepas foram escolhidas para serem analisadas no presente estudo por terem sido isoladas de um produto de origem animal e da cadeia produtiva de um produto vegetal, em cidades diferentes do RS e possuírem potencial patogenicidade para se tornarem agentes etiológicos de surtos alimentares no RS. O nome das cidades não foi informado, a fim de preservar os estabelecimentos de onde as cepas foram isoladas. Cabe informar que as autoridades sanitárias foram oficialmente informadas de onde e quando tais microrganismos foram isolados.

Neste trabalho foi utilizada como controle negativo uma cepa padrão de *Escherichia coli*, não STEC, identificada como *E. coli* ATCC 8739.

4.2. Recuperação das culturas microbianas

Antes de cada experimento as cepas de *E. coli* O157:H7 foram recuperadas, através de semeadura em Caldo TSBm (Modified Tryptone Soy Broth, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 37°C, por 18-24h. As amostras recuperadas foram em Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de cefixima e 2,5 mg.L⁻¹ de telurito de potássio (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 37 °C, por 18 h a 24 h para controle da pureza das cepas.

Após confirmada a recuperação e a pureza das culturas, as mesmas foram submetidas aos procedimentos de preparação de inóculo de acordo com a necessidade de cada um dos experimentos realizados.

4.3. Preparo do Inóculo

Para obtenção do inóculo alíquotas de 100 µL das cepas de *E. coli* O157:H7 foram semeadas em Caldo TSBm e incubadas a 37°C, por 24h a fim de obter uma suspensão fisiologicamente ativa da cepa estudada.

Para a realização do experimento de resistência térmica, além do procedimento de obtenção do pré-inóculo descrito acima, foram utilizadas as cepas ácido adaptadas. Para tanto, alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana fisiologicamente ativa, foram semeados em Caldo TSBm adicionado de 1% de glicose e incubados a 37°C, por 24h para obtenção do inóculo ácido-

adaptado cujo pH final após incubação foi de 4,5 (adaptado de MALHEIROS et al, 2009).

4.4. Procedimentos de análise

4.4.1. Resistência térmica de cepas de *E. coli* O157:H7

Na avaliação da resistência térmica alíquotas de 100 µL de cada inóculo (A13P3, CC e ATCC8739) com aproximadamente 10⁸UFC/mL foram transferidas, separadamente para Eppendorf contendo de 900 µL de Caldo TSBm previamente aquecidos em bloco térmico (AccuBlock Digital Dry Bath, Marca: Labnet International, Woodbridge, USA). As temperaturas utilizadas foram 50, 58, 60, 65, 70, 72, 75 e 80°C (adaptado de Malheiros et al, 2009). De cada Eppendorf, previamente aquecido e inoculado, alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos 0 (heating-up time = 10±2s), 1, 2 e 3 minutos para quantificação bacteriana. Para tanto, foram realizadas diluições decimais em 900 µL água peptonada 0,1% estéril, e após agitação, alíquotas de 20µL das diluições apropriadas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), as quais foram incubadas por 24h a 37°C. A quantificação das células bacterianas foi realizada de acordo com a técnica da gota descrita por Silva (1997) e utilizada por Malheiros et al. (2009), nesta técnica as gotas de 20µL da diluição desejada foram semeadas na superfície das placas contendo o ágar e, após a secagem da gota, as placas foram invertidas e incubadas. Assumiu-se “redução total” quando não se observou crescimento em placas, indicando que houve inativação após o tratamento ou as contagens estavam abaixo do limite de detecção do teste.

Cada experimento foi realizado três vezes, sendo as contagens realizadas em triplicata.

O procedimento também foi realizado com inóculos ácido adaptados para as temperaturas de 60 e 70°C. A temperatura de 60°C foi escolhida por ser a temperatura mínima requerida na manutenção quente (exposição em bufe) de alimentos em serviços de alimentação, enquanto 70°C é a temperatura mínima indicada pela legislação brasileira na cocção dos alimentos a fim de garantir a segurança dos alimentos preparados (Brasil 2004, SES-RS 2009).

4.4.2. Avaliação da resistência ácida de *E. coli* O157:H7

Para a avaliação da resistência ácida a diferentes pH, alíquotas de 50 µL (aproximadamente 10⁸UFC/mL) dos inóculos foram transferidas para placas estéreis de poliestireno para cultura celular de 12 poços (CELLSTAR®, Greiner Bio-One do Brasil, Americana, Brasil). Cada poço contendo 3mL de Caldo TSBm, previamente acidificados com HCl (ácido clorídrico PA, Synthi, Diadema, Brasil) e com ácido propiônico (ácido propiônico PA, Synthi, Diadema, Brasil) separadamente. Os pH bem como os tempos avaliados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos utilizados na avaliação da resistência ácida de cepas de *E. coli*.

Ácido utilizado	pH final da solução de TSBm	Tempo de exposição (min)	Ácido utilizado	pH final da solução de TSBm	Tempo de exposição (min)
HCl	2,0	0	AP	2,0	0
		1			1
		2			2
		3			3
	3,5	0		3,5	0
		1			1
		2			2
		3			3
	4,5	0		4,5	0
		1			1
		2			2
		3			3
	6,5	0		6,5	0
		1			1
		2			2
		3			3
	9,5*	0		9,5*	0
		1			1
		2			2
		3			3

* O pH de 9,5 foi obtido, alcalinizando o meio com NaOH e ajustado com HCl ou AP, separadamente.

Depois de 0, 1, 2 e 3 minutos de exposição, alíquotas de 100 µL foram tomadas e serialmente diluídas em 900 µL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) estéril e alíquotas de 20 µL das diluições apropriadas foram semeadas em Agar Nutriente, e incubadas por 24h a 37°C. A quantificação das células bacterianas foi realizada de acordo com a técnica da gota descrita por Silva (1997) e utilizada por Malheiros et al (2009). Assumiu-se “redução total” quando não se observou crescimento em placas, indicando que houve inativação após o tratamento ou as contagens estavam abaixo do limite de detecção do teste. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente em três repetições e as contagens foram realizadas em triplicata.

4.4.3. Avaliação da redução de *E. coli* O157:H7 frente a diferentes desinfetantes

Para a realização deste teste foram utilizadas suspensões bacterianas das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e como controle não O157, foi utilizada *E. coli* ATCC 8739. Antes de cada experimento a cepa de *E. coli* O157:H7 foi recuperada conforme descrito no item 5.2. Em seguida, alíquotas de 1mL do inóculo, de cada uma das cepas foram diluídas em 9 mL de água peptonada 0,1% estéril (separadamente), a fim de atingir uma concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL, constituindo os inóculos que foram utilizados na avaliação da resistência aos diferentes desinfetantes.

4.4.3.1. Avaliação da resistência aos desinfetantes

A avaliação da resistência aos desinfetantes foi realizada através do teste de suspensão adaptado da Portaria 101/93, do MAPA (BRASIL, 1993). Para tanto foram preparadas soluções de quatro dos principais desinfetantes utilizados na indústria de alimentos e serviços de alimentação, os quais foram: desinfetante A (princípio ativo dicloroisocianurato de sódio), desinfetante B (princípio ativo ácido láctico e ácido cítrico), desinfetante C (princípio ativo cloreto benzalcônio do grupo quaternário de amônia) e álcool etílico 96°GL. Os nomes comerciais dos desinfetantes não foram citados a fim de preservar o fabricante que gentilmente cedeu os mesmos para a realização deste estudo.

Os tratamentos consistiram na exposição das cepas estudadas frente a diferentes diluições dos desinfetantes. Todos os desinfetantes foram avaliados após oito tempos de exposição (0, 1, 2, 3, 15, 20, 30 e 45 min) (adaptado de MALHEIROS et al, 2009).

Para o dicloroisocianurato de sódio (A), ácido orgânico (B) e quaternário de amônia (C), foram utilizadas as seguintes concentrações: concentração recomendada pelo fabricante (1x), a metade da diluição recomendada pelo fabricante (0,5x), um quarto da concentração recomendada (0,25x) e o dobro (2x) da diluição recomendada pelo fabricante. O álcool etílico 96°GL, foi utilizado sem diluir e diluído a 70%.

O procedimento de análise foi realizado da utilizando tubos de ensaio contendo as soluções dos desinfetantes (9 mL) adicionados de matéria orgânica (albumina bovina 1%, Sigma Aldrich Brasil Ltda, SP, Brasil) e inoculados com 0,1 mL da suspensão de inóculo, resultando na concentração bacteriana de aproximadamente 10^6 UFC/mL. Em seguida, os tubos inoculados foram agitados para homogeneização e o tempo de exposição foi cronometrado a partir do momento da adição da cultura ao desinfetante. Após os tempos de exposição nas condições descritas acima, alíquotas de 20 μ L foram coletadas e semeadas na superfície de placas de petri contendo Agar Nutriente as quais foram incubadas por 24h, a 37°C. A quantificação das células foi realizada de acordo com a técnica da gota descrita por Silva (1997) e utilizada por Malheiros et al (2009). Assumiu-se “redução total” quando não se observou crescimento em placas, indicando que houve inativação após o tratamento ou as contagens estavam abaixo do limite de detecção do teste. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente em três repetições e as contagens realizadas em triplicata.

4.4.4. Avaliação dos processos de lavagem e desinfecção de alfaces artificialmente contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7

Para realização deste trabalho foram utilizadas as metodologias propostas por Oliveira et al (2012) e Gündüz, Gönül, Karapinar (2010) e Lang, Harris, Beuchat (2004), com adaptações. Na realização deste teste foi utilizada apenas cepa *E. coli* O157: H7 identificada como CC, a mesma foi escolhida em função da origem do seu isolamento descrita no item 5.1.

4.4.4.1. Preparo do inóculo

Antes de cada experimento a cepa de *E. coli* O157:H7 foi recuperada conforme descrito no item 5.2. Em seguida, a partir uma alíquota de inóculo com cultivo *overnight* (18-24h/37°C) foram realizadas diluições decimais até a obtenção da suspensão bacteriana 10^7 UFC/mL.

4.4.4.2. Aquisição e preparo da alface

Alfaces crespa (*Lactuca sativa* L.) de cultivo tradicional, foram adquiridas nos supermercados locais no máximo a 24 horas antes da realização de cada experimento. Foram adquiridas alfaces sempre do mesmo fornecedor.

Após serem adquiridas as alfaces foram levadas para o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos onde foram preparadas para o uso. Para tanto, as folhas externas foram removidas e o restante das folhas lavadas uma a uma em água corrente em seguida as mesmas foram desinfetadas através da imersão durante 15 minutos em solução clorada (200 ppm de cloro residual) obtida pela diluição de 10 ml em um litro de água sanitária 2,5%. Em seguida, foi realizado o enxague com água corrente e o excesso de água

removido com auxílio de uma centrífuga manual. A alface higienizada foi então aliqüotada em sacos plásticos estéreis em porções de 10 g. Foram utilizadas 12 porções de 10 g de alface (do mesmo lote) para cada repetição do experimento.

4.4.4.3. Contaminação artificial da alface

Para a obtenção das alfaces artificialmente contaminadas foi feita a inoculação de *E. coli* O157:H7, foi utilizado 10 mL do inóculo da cepa CC preparados como descrito acima (10^7 UFC/ mL) e colocados sobre 10 g de alfaces armazenadas nos sacos plásticos estéreis. A homogeneização do inóculo com a alface foi realizada através de agitação manual durante 30 segundos e as folhas foram então mantidas durante mais 2,5 minutos em contato com o inóculo, totalizando 3 minutos de contato.

Após o tempo de contato os 10 g de alface contaminada foram então, submetidas aos métodos de lavagem e desinfecção. Em todos os experimentos uma alíquota de 10g de alface contaminada artificialmente foi utilizada como controle negativo (não submetida a nenhum tratamento de limpeza e/ou desinfecção).

4.4.4.4. Tratamento da alface artificialmente contaminada

As folhas da alface inoculadas pesadas e subdivididas em porções de 10 g foram submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos utilizados na avaliação da higienização de alfaces artificialmente contaminadas com *E. coli* O157:H7(CC).

Tratamento	Contaminação artificial	Procedimento de lavagem	Procedimento de desinfecção	Procedimento de enxágue
T0 (controle negativo)	sim	não	não	não
T1	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	não	não
T2	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de água potável por 15 minutos	não
T3	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 50 ppm de cloro livre, por 15 minutos	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T4	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro livre, por 15 minutos	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T5	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro livre, por 5 minutos	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T6	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro livre, por 1 minutos	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T7	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro livre, por 15 minutos/10°C	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T8	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de hipoclorito de sódio a 200 ppm de cloro livre, por 10 minutos (sanitizante comercial A)	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T9	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão em 200 mL de solução de vinagre de vinho a 2% por	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação

			15 minutos	manual)
T10	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão 200 mL de em solução de ácido peracético 200ppm por 15 minutos	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)
T11	sim	imersão em 100 mL de água potável (30s, com agitação manual)	imersão 200 mL de em dicloroisocianurato de sódio, com 130 ppm de cloro livre, por 15 minutos (sanitizante comercial B)	imersão em 100m L de água potável (30s, com agitação manual)

Sim: a etapa faz parte do tratamento.

Não: a etapa não faz parte do tratamento.

Os sanitizantes A e B foram utilizados na dosagem e tempos de contato recomendados pelos respectivos fabricantes. Ambos são sanitizantes a base dicloroisocianurato de sódio.

Todos os tratamentos foram conduzidos em três repetições em dias diferentes. Todos os resíduos gerados durante os tratamentos foram coletados em bombonas plásticas e submetidos a esterilização em autoclave, antes de serem descartados.

4.4.4.5. Avaliação dos Tratamentos

Após terem sido submetidas aos diferentes tratamentos as alfaces tratadas foram submetidas à quantificação de *E. coli* O157:H7 e microrganismos mesófilos totais. Para tanto as porções de 10 g das alfaces tratadas foram diluídas em 90 ml de água peptonada 0,1% (Oxoid), após a homogeneização foram feitas diluições decimais e o plaqueamento em meio seletivo e não seletivo de acordo com o microrganismo quantificado. Para a quantificação da *E. coli* O157:H7, 20 µL das diluições apropriadas foram semeadas através da técnica da gota na superfície de placas de petri contendo

ágar SMAC-CT (MacConkey sorbitol, suplementado com cefixina-telurito (0,05 mg/L, Oxoid). Para a quantificação microrganismos mesófilos totais, 20 µL das diluições apropriadas foram semeadas através da técnica da gota na superfície de placas de petri contendo ágar Ágar Nutriente (Oxoid). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação todas as colônias características no SMA-CT, foram contadas para a enumeração da *E. coli* O157:H7 e no Ágar Nutriente todas colônias foram contadas para enumeração dos mesófilos totais. Assumiu-se “redução total” quando não se observou crescimento em placas, indicando que houve inativação após o tratamento ou as contagens estavam abaixo do limite de detecção do teste.

Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente com exceção foi o tratamento T7, que foi conduzido a 10°C. As análises foram realizadas em três repetições e as contagens foram realizadas em triplicata.

4.4.4.6. Cálculo da redução microbiana para análise estatística

A análise estatística foi realizada com base na média das reduções da contagem de microrganismos mesófilos totais (MT) e *E. coli* O157:H7 (CC). Em relação a contaminação inicial. As reduções foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$RMT = (\text{UFC/g MT no } T_0) - (\text{UFC/g MT no } T_n)$$

Onde: RMT representa o resultado da contagem de microrganismos mesófilos totais, T0 é o controle e Tn é cada tratamento (T1 ao T11).

$$RCC = (\text{UFC/g CC no } T_0) - (\text{UFC/g CC no } T_n)$$

Onde: RCC representa o resultado da contagem de *E. coli* O157:H7, T0 é o controle e Tn é cada tratamento (T1 ao T11).

Para a determinação da redução dos MT e CC obtidos pela ação isolada dos saneantes utilizados nos tratamentos utilizou-se as seguintes fórmulas.

$$\text{RMT} = (\text{UFC/g MT no T0}) - (\text{UFC/g MT no T1}) - (\text{UFC/g MT no Tn})$$

Onde: RMT representa o resultado da contagem de microrganismos mesófilos totais, T0 é o controle, T1 é a redução pela lavagem (limpeza) e Tn é cada tratamento onde se faz uso de saneantes (T3 ao T11).

$$\text{RCC} = (\text{UFC/g CC no T0}) - (\text{UFC/g CC no T1}) - (\text{UFC/g CC no Tn})$$

Onde: RCC representa o resultado da contagem de *E. coli* O157:H7, T0 é o controle, T1 é a redução pela lavagem (limpeza) e Tn é cada tratamento onde se fez uso de saneantes (T2 ao T11).

Todos os resultados foram expressos em logUFC/g.

4.5. Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística. A análise foi realizada com base nos valores das medias das contagens obtidas em cada experimento. Para tanto os dados foram tabulados e lançados no programa de análise estatística SPSS versão 21.0. A comparação das médias foi feita utilizando o teste de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados de cada experimento foram avaliados individualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da resistência térmica de cepas de *E. coli* O157:H7

A Tabela 3 apresenta as reduções obtidas após exposição das cepas de *E. coli* O157:H7 (A13P3 e CC) e da cepa controle *E. coli* ATCC8739 a temperatura de 58, 60, 62, 65, 70, 72, 75 e 80°C. A temperatura de 85°C não foi avaliada como previsto inicialmente, pois a 80°C não houve crescimento de nenhuma das cepas analisadas para nenhum dos tempos de exposição, conclui-se, portanto que a 85°C a temperatura também é letal para todas as cepas.

Tabela 3. Reduções médias das contagens e desvio padrão após avaliação da resistência térmica em diferentes condições de tempo e temperatura de três cepas de *E. coli*.

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (t=min)	Redução em relação ao inóculo* (log UFC/mL)		
		A13P3	CC	ATCC8739
50	0	1,15 ± 0,43 ^a	1,39 ± 0,70 ^a	1,12 ± 0,10 ^a
	1	1,28 ± 0,64 ^a	1,43 ± 0,63 ^a	1,39 ± 0,68 ^a
	2	1,34 ± 0,68 ^a	1,41 ± 0,69 ^a	1,02 ± 0,20 ^a
	3	1,26 ± 0,64 ^a	1,34 ± 0,70 ^a	1,10 ± 0,27 ^a
	média	1,26 ± 0,58	1,39 ± 0,65	1,15 ± 0,39
58	0	1,78 ± 0,37 ^a	1,45 ± 0,46 ^a	1,29 ± 0,42 ^a
	1	1,90 ± 0,32 ^a	1,89 ± 0,44 ^{ab}	1,48 ± 0,51 ^a
	2	2,92 ± 0,80 ^b	1,65 ± 0,28 ^{ab}	1,54 ± 0,42 ^a
	3	3,04 ± 1,25 ^b	2,04 ± 0,21 ^b	1,76 ± 0,48 ^a
	média	2,41 ± 0,95	1,76 ± 0,42	1,52 ± 0,47
60	0	1,95 ± 0,74 ^a	1,75 ± 0,55 ^a	1,37 ± 0,55 ^a

	1	2,92 ± 1,12 ^a	4,64 ± 0,52 ^b	1,90 ± 1,06 ^{ab}
	2	3,78 ± 0,81 ^{ab}	2,50 ± 0,07 ^b	1,70 ± 0,06 ^{ab}
	3	4,97 ± 2,79 ^b	8,47 ± 0,22 ^c	2,56 ± 0,65 ^b
	média	3,41 ± 1,90^b	3,84 ± 2,76	1,88 ± 0,79
65	0	2,26 ± 0,32 ^a	1,90 ± 0,65 ^a	2,39 ± 0,78 ^a
	1	7,43 ± 1,41 ^b	7,10 ± 1,34 ^b	7,18 ± 1,66 ^b
	2	6,20 ± 1,57 ^{bc}	7,52 ± 1,65 ^b	7,93 ± 0,86 ^b
	3	8,30 ± 0,09 ^c	7,57 ± 1,57 ^b	8,37 ± 0,09 ^b
	média	6,06 ± 2,57	6,02 ± 2,75	6,61 ± 2,56
70	0	2,71 ± 0,29 ^a	2,83 ± 0,48 ^a	3,31 ± 0,32 ^a
	1	6,12 ± 1,80 ^b	7,04 ± 1,89 ^b	7,44 ± 1,27 ^b
	2	7,40 ± 1,46 ^{bc}	7,54 ± 1,62 ^b	7,44 ± 1,27 ^b
	3	8,33 ± 0,09 ^c	7,57 ± 1,57 ^b	8,34 ± 0,08 ^b
	média	6,14 ± 2,43	6,25 ± 2,46	6,63 ± 2,16
72	0	3,70 ± 0,64 ^a	3,85 ± 0,31 ^a	3,64 ± 0,64 ^a
	1	6,37 ± 0,85 ^b	7,81 ± 0,95 ^b	8,34 ± 0,08 ^b
	2	8,33 ± 0,09 ^c	8,47 ± 0,22 ^b	8,34 ± 0,08 ^b
	3	8,33 ± 0,09 ^c	8,47 ± 0,22 ^b	8,34 ± 0,08 ^b
	média	6,68 ± 2,14	7,15 ± 2,02	7,16 ± 2,09
75	0	4,50 ± 0,34 ^a	4,44 ± 0,36 ^a	3,93 ± 0,29 ^a
	1	6,48 ± 1,37 ^b	6,69 ± 1,81 ^b	6,70 ± 1,21 ^b
	2	8,33 ± 0,09 ^c	8,47 ± 0,22 ^c	8,34 ± 0,08 ^c
	3	8,33 ± 0,09 ^c	8,47 ± 0,22 ^c	8,34 ± 0,08 ^c
	média	6,91 ± 1,74	7,02 ± 1,90	6,83 ± 1,92
80	0	8,33 ± 0,09 ^a	8,47 ± 0,22 ^a	8,34 ± 0,08 ^a
	1	8,33 ± 0,09 ^a	8,47 ± 0,22 ^a	8,34 ± 0,08 ^a
	2	8,33 ± 0,09 ^a	8,47 ± 0,22 ^a	8,34 ± 0,08 ^a
	3	8,33 ± 0,09 ^a	8,47 ± 0,22 ^a	8,34 ± 0,08 ^a
	média	8,33 ± 0,09^a	8,47 ± 0,22^a	8,34 ± 0,08^a

*Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Também foi avaliada a resistência térmica com as mesmas cepas ácido adaptadas A13P3AD, ATCC8739AD e CCAD para as temperaturas de 60

e 70°C. A Tabelas 4 apresenta as reduções obtidas após exposição das cepas ácido adaptadas a temperatura de 60 e 70°C.

Tabela 4. Reduções médias das contagens e desvio padrão após avaliação da resistência térmica em diferentes condições de tempo e temperatura de três cepas de *E. coli* ácido adaptadas (AD).

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (t=min)	Redução (log) em relação ao inóculo* (UFC/mL)		
		A13P3AD	CCAD	ATCC8739AD
60	0	1,19 ± 0,36 ^a	1,42 ± 0,60 ^a	1,45 ± 0,59 ^a
	1	1,98 ± 0,05 ^b	1,49 ± 0,59 ^a	1,42 ± 0,61 ^a
	2	2,57 ± 0,26 ^c	1,41 ± 0,50 ^a	1,44 ± 0,28 ^a
	3	3,04 ± 0,56 ^d	1,64 ± 0,23 ^a	1,65 ± 0,32 ^a
	média	2,19 ± 0,78	1,49 ± 0,49	1,49 ± 0,47
70	0	2,52 ± 0,31 ^a	2,90 ± 0,62 ^a	2,51 ± 0,00 ^a
	1	8,13 ± 0,00 ^b	6,41 ± 1,56 ^b	7,64 ± 1,31 ^b
	2	8,13 ± 0,00 ^b	7,98 ± 1,0 ^c	8,51 ± 0,00 ^c
	3	8,13 ± 0,00 ^b	8,49 ± 0,00 ^c	8,51 ± 0,00 ^c
	média	6,73 ± 2,47	6,44 ± 2,41	6,80 ± 2,61

*Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados demonstraram que quando expostas a 50°C e 80°C ao longo de 0, 1, 2 e 3 minutos de exposição não foram observadas diferenças significativas entre as cepas A13P3, ATCC8739 e CC em relação à redução nas contagens. Para 50°C as reduções médias do tratamento foram 1,26 ± 0,58 log UFC/ml para A13P3, 1,15 ± 0,39 log UFC/ml para ATCC8739 e 1,19 ± 0,65 log UFC/ml para CC e para 80°C houve redução total de todas as cepas (Tabela 3).

A 58°C em t=0 a cepa A13P3 teve redução significativamente maior que a cepa ATCC8739 e equivalene a cepa CC. Nos tempos 1, 2 e 3 a cepa mais sensível ao tratamento foi a A13P3 com reduções de 1,90± 0,37 log

UFC/ml, $2,92 \pm 0,80$ log UFC/ml e $3,04 \pm 1,25$ log UFC/ml, respectivamente. As reduções obtidas para a cepa A13P3 nos tempos 0 e 1 não diferem entre si, e para os tempos de exposição de 2 e 3 minutos há um aumento na redução obtida após 3 minutos de exposição, este, no entanto, não é significativo o que indica que dois minutos a 58°C são suficientes para a inativação de 3 log da A13P3. Para as cepas ATCC8739 e CC ambas apresentaram reduções similares entre si a 2 e 3 minutos de exposição a 58°C. Nesta temperatura a cepa de *E. coli* O157:H7 de origem ambiental (CC) teve uma redução média de 2 log para tempos de 2 e 3 minutos de exposição (Tabela 3), sendo portanto mais resistente quando comparada com cepa de *E. coli* O157:H7 de origem animal (A13P3), com aproximadamente 1log de diferença entre ambas. Para 1 minuto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

A 60°C em t=0 minutos de exposição não foram observadas diferenças significativas entre as cepas A13P3, A13P3AD, ATCC8739, ATCC8739AD, CC e CCAD em relação à redução nas contagens. No entanto, para 1 minuto de exposição à cepa mais sensível ao tratamento foi a A13P3, seguida de CC e A13P3AD, ATCC8739 (similares entre si), enquanto as cepas CCAD e ATCC8739AD, se mostraram significativamente mais resistentes neste tratamento.

Após 2 minutos de exposição na temperatura de 60°C as cepas mais resistentes foram a ATCC8739, ATCC8739 AD e CC, sendo que após 3 minutos nessa mesma temperatura as cepas ácido adaptadas mostram-se mais resistentes do que as não adaptadas. CC foi mais sensível em relação a A13P3 a partir de 2 minutos de exposição e após 3 minutos foi totalmente

inativada (não houve crescimento) enquanto a A13P3 ainda se encontrava viável.

A temperatura de 65°C diferenças significativas foram observadas apenas a 2 minutos de exposição, onde a cepa ATCC8739 apresentou a maior redução e a A13P3 foi a mais resistente enquanto a cepa CC apresentou redução intermediária.

Para a temperatura de 70°C exceto no tempo zero, as reduções das cepas de O157:H7 CC e A13P3 não apresentaram diferenças significativas entre si e entre suas versões ácido adaptadas nessa temperatura.

Após 1 e 2 minutos a 70° no entanto, as reduções das cepas ácido adaptadas e não adaptadas não diferiram entre si. Para esta temperatura, observa-se nas tabelas 1 e 2, que a partir de um minuto as cepas apresentaram 6 log ou mais de redução e após 3 minutos de exposição todas as cepas apresentaram redução completa do inóculo, inclusive as ácido adaptadas.

De acordo com a legislação brasileira para serviços de alimentação (Brasil, 2004), durante os processos de cocção o centro geométrico do alimento deve atingir 70°C a fim de garantir a segurança do mesmo. Os resultados observados indicam, no entanto, que em se tratando da O157:H7 o alimento deve permanecer ao pelo menos um minuto nessa temperatura para a inativação da mesma. Considerando a baixa dose infectante da O157:H7 a capacidade de sobrevivência ao tratamento térmico pode ser responsável pela ocorrência de surtos alimentares.

A temperatura de 72°C após 1 minuto de exposição as cepas ATCC8739 e CC foram totalmente inativadas, enquanto a cepa A13P3 apresentou redução de $6,37 \pm 1,84$ log UFC/ml (Tabela 3). Após 2 minutos de exposição todas as cepas foram inativadas.

Após um minuto de exposição a 75°C as reduções não diferiram entre si e as contagens foram significativamente reduzidas, e após 2 minutos de exposição houve redução total do inóculo (placas de cultivo sem crescimento).

Analisando-se a eficácia dos tratamentos aplicados a cada cepa (Tabelas 3 e 4), para a A13P3 observa-se que a redução total da mesma só foi observada após 3 minutos de exposição a 65°C, reduções semelhantes foram observadas após 2 e 3 minutos a 70°C, 2 minutos a 72°C e 75°C.

A cepa CC demonstrou-se mais sensível sendo inativada após 3 minutos a 60°C e um minuto a 65°C, a partir de 70°C apresentou comportamento similar ao da A13P3. Após a adaptação ácida, no entanto, a 60°C a cepa CC apresentou maior resistência significativamente maior, enquanto a que a cepa não ácido adaptada apresentou inativação total após 3 minutos de exposição a essa temperatura, a cepa ácido adaptada teve apenas $1,64 \pm 0,23$ logUFC/ml de redução nas mesmas condições.

Esses resultados demonstram que após atingir 70°C no centro geométrico do alimento a mesma deveria permanecer pelo menos um minuto nesta temperatura. A legislação estadual de SP (CVS-SP, 2013) recomenda como critério de segurança durante a cocção de alimentos 74 °C, o que vai de encontro com os resultados obtidos no presente estudo em se tratando da *E.coli* O157:H7.

A cepa ATCC8739 demonstrou-se mais resistente a 60°C do que as cepas de *E. coli* O157:H7, a partir de 65°C, no entanto, demonstrou comportamento semelhante sendo totalmente inativada a partir de um minuto a 70°C.

A cepa A13P3AD quando exposta a temperatura de 60° apresenta redução significativa entre todos os tempos avaliados, sendo em ordem decrescente de redução os tempos de 3, 2, 1 e 0 minutos (3,04 ± 0,55 log UFC/ml, 2,56 ± 0,26 log UFC/ml, 1,97 ± 0,05 log UFC/ml e 1,18 ± 0,36 log UFC/ml, respectivamente). A 70°C de exposição observa-se redução completa do inóculo após 1 minuto de exposição.

A cepa ATCC8739AD quando exposta a temperatura de 60° não apresentou redução significativa entre os tempos avaliados. Para 70°C após 2 minutos houve a redução total do inóculo (8,51 ± 0,00 log UFC/ml).

A cepa CCAD quando exposta a temperatura de 60° não apresentou redução significativa entre os tempos avaliados. Para 70°C após 3 minutos houve a redução completa do inóculo (8,48 ± 0,00 log UFC/ml), redução estatisticamente igual a obtida com 2 minutos de exposição, enquanto a cepa não adaptada havia sido totalmente reduzida após 1 minuto a 70°C.

Entre as principais causas de infecções por *E. coli* além do contato direto com pessoas ou animais infectados o consumo de produtos frescos, água contaminada e, especialmente carne moída mal cozida são os mais frequentes (CAPRIOLI et al, 2005).

A adaptação das células bacterianas no trato gastrointestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido resistência, *E. coli* O157 com sistema

de ácido resistência induzido pode permanecer resistente ao ácido nos alimentos por um determinado período (CHUNG et al, 2006).

Rowbury (1995) através de estudo sobre os fatores ambientais que influenciam a tolerância e sensibilidade em ácido de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e outras enterobactérias e outras enterobactérias concluíram que a indução da tolerância *Escherichia coli* a ácidos também pode aumentar a habilidade do organismo em sobreviver a outros estresses, como a resistência do microrganismo ao aquecimento, radiação e antimicrobianos. *E. coli* também possui uma resposta de tolerância a álcalis (ROWBURY et al, 1996). Este fenomeno também foi observado recentemente por Malheiros et al (2009) que avaliaram a sobrevivência/crescimento de *Salmonella* Enteritidis ácido-adaptadas e não ácido-adaptadas submetidas a diferentes tratamentos onde cepas ácido adaptadas foram também mais resistentes quando submetidas ao tratamento térmico.

Esse resultado também foi observado no presente estudo onde, nas temperaturas de 58, 60, 65 e 70°C houve redução nas contagens de todas as cepas, porém a redução completa só foi observada após 3 minutos a 60°C (ou 1 min a 65°) para a *E. coli* O157:H7 CC, 1 min a 65°C para as *E. coli* ATCC8937 e 2 minutos *E. coli* O157:H7 A13P3. Após adaptação ácida, no entanto, a 60°C nenhuma cepa foi inativada incluindo a CC, e as reduções das contagens foram no mínimo 1 log inferiores as obtidas para as cepas não adaptadas. A 70°C foi necessário 1 minutos de exposição para a redução significativa de todas as cepas não adaptadas, enquanto as adaptadas, no

geral, só foram totalmente reduzidas após 2 minutos de exposição a mesma temperatura.

A maioria dos surtos relatados envolvendo *E. coli* O157:H7 cuja fonte foram alimentos de origem animal estão relacionados com falhas no processo de cocção, relatadas desde o primeiro surto ocorrido em 1983, causado por hamburger mau cozido (RILEY, 1983). Bem como o caso, mais conhecido de todos, envolvendo uma rede de “fast food” dos USA também relacionado ao consumo de carne mal cozida (CDC 1993).

Souza et al, (2011) analisaram as características clínicas e microbiológicas associadas com 13 casos de SHU pós-diarreicas identificados em unidades de terapia intensiva pediátrica na cidade de São Paulo, ocorridos entre janeiro de 2001 a agosto de 2005. ATCC8739 foram isoladas a partir de três dos sete pacientes cujas culturas de fezes renderam crescimento bacteriano, e os sorotipos identificados foram 26:H11, O157:H7 e O165:HNM. Segundo os pesquisadores a fonte de infecção foi não rastreada neste estudo, contudo o consumo leite não pasteurizado ou carne mal cozida foram relatados, podendo ser a principal causa de infecção na maioria dos casos estudados. Os resultados do presente estudo, demonstram que a adoção de procedimentos adequados de cozimento são uma medida de controle eficiente frente a O157:H7 e que casos como estes, relatados por Souza et al, poderiam ser evitados.

Apesar da existência dos vários relatos de alimentos investigados sem casos de SHU, a única implicação de *E. coli* O157:H7 veiculada por alimentos no Brasil, descrita na literatura, é o caso de um surto com dois casos

de diarreia, sem SHU, ocorrido em Campinas, em 2001, supostamente causado por ingestão de carne mal cozida. (CVE/SES-SP, 2011). Esses dados reforçam a importância da investigação da resistência térmica dos isolados do sul Brasil.

5.2. Avaliação da resistência ácida de *E. coli* O157:H7

As Tabelas 5 e 6 apresentam as reduções obtidas após a exposição das cepas de *E. coli* O157:H7 denominadas A13P3 e CC e da cepa controle ATCC8739, não O157, em soluções caldo TSBm acidificado com ácido clorídrico e ácido propionico alcançando diferentes pH.

Tabela 5. Reduções logarítmicas e desvio padrão obtidos após avaliação da resistência ácida de três cepas de *E. coli* em meio acidificado com ÁCIDO CLORÍDRICO em diferentes condições de tempo e pH.

pH	Tempo de exposição (t=min)	Redução (log) em relação ao inóculo* (UFC/mL)		
		A13P3	CC	STE
2,0	0	1,45±1,10 ^{ab}	1,77±0,25 ^a	1,34±0,22 ^a
	1	1,27±1,05 ^a	1,93±0,27 ^a	1,38±0,30 ^a
	2	2,45±0,31 ^{bc}	2,01±0,37 ^a	1,53±0,19 ^a
	3	2,75±0,50 ^c	2,16±0,39 ^a	2,10±0,46 ^b
3,5	0	1,47±0,43 ^a	1,64±0,21 ^a	1,86±0,27 ^a
	1	1,39±0,52 ^a	1,73±0,18 ^a	1,88±0,30 ^a
	2	1,42±0,45 ^a	1,64±0,22 ^a	1,67±0,09 ^a
	3	0,95±0,81 ^a	1,63±0,19 ^a	1,66±0,16 ^a
4,5	0	1,38±0,49 ^a	1,58±0,22 ^a	1,65±0,14 ^a
	1	1,35±0,48 ^a	1,61±0,18 ^a	1,66±0,19 ^a
	2	1,33±0,51 ^a	1,59±0,17 ^a	1,56±0,22 ^a
	3	1,52±0,44 ^a	1,67±0,19 ^a	1,57±0,18 ^a
6,5	0	1,32±0,56 ^a	1,65±0,32 ^a	1,18±0,89 ^a

	1	1,39±0,50 ^a	1,62±0,30 ^a	1,08±0,84 ^a
	2	1,04±0,86 ^a	1,61±0,18 ^a	1,06±0,83 ^a
	3	1,44±0,60 ^a	1,70±0,16 ^a	1,03±0,79 ^a
9,5	0	1,48±0,44 ^a	1,67±0,15 ^a	1,51±0,38 ^a
	1	1,44±0,66 ^a	1,66±0,14 ^a	1,57±0,38 ^a
	2	1,50±0,43 ^a	1,66±0,13 ^a	1,33±0,55 ^a
	3	1,44±0,74 ^a	1,66±0,20 ^a	1,59±0,18 ^a

* Média dos Inóculos: A13P3: 7,88±0,56log UFC/ml; CC: 8,05±0,00g UFC/ml; CC: 8,25±0,14log UFC/ml

**Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 6. Reduções logarítmicas e desvio padrão obtidos após avaliação da resistência ácida de três cepas de *E. coli* em meio acidificado com ÁCIDO PROPIÔNICO em diferentes condições de tempo e pH.

pH	Tempo de exposição (t=min)	Redução (log) em relação ao inóculo* (UFC/mL)		
		A13P3	CC	STE
2,0	0	7,88±0,56 ^a	8,05±0,00 ^a	8,25±0,14 ^a
	1	7,88±0,56 ^a	8,05±0,00 ^a	8,25±0,14 ^a
	2	7,88±0,56 ^a	8,05±0,00 ^a	8,25±0,14 ^a
	3	7,88±0,56 ^a	8,05±0,00 ^a	8,25±0,14 ^a
3,5	0	1,37±0,54 ^a	1,66±0,20 ^a	1,41±0,23 ^{ab}
	1	1,40±0,45 ^a	1,71±0,24 ^a	1,50±0,24 ^{ab}
	2	1,47±0,45 ^a	1,63±0,21 ^a	1,00±0,77 ^a
	3	1,59±0,58 ^a	1,75±0,27 ^a	1,64±0,34 ^b
4,5	0	0,74±0,61 ^a	1,77±0,39 ^a	1,63±0,23 ^a
	1	0,77±0,67 ^a	1,77±0,26 ^a	1,59±0,18 ^a
	2	0,89±0,82 ^a	1,62±0,21 ^a	1,67±0,11 ^a
	3	0,80±0,66 ^a	1,53±0,20 ^a	1,63±0,16 ^a
6,5	0	1,44±0,51 ^a	1,64±0,14 ^a	1,76±0,11 ^{ab}
	1	1,44±0,60 ^a	1,75±0,15 ^a	1,90±0,27 ^b
	2	1,45±0,48 ^a	1,60±0,21 ^a	1,62±0,19 ^a

	3	1,37±0,43 ^a	1,61±0,17 ^a	1,58±0,14 ^a
9,5	0	1,39±0,45 ^a	1,70±0,27 ^a	1,67±0,12 ^b
	1	1,50±0,49 ^a	1,65±0,19 ^a	0,99±0,81 ^a
	2	1,46±0,47 ^a	1,88±0,41 ^a	1,70±0,06 ^b
	3	1,42±0,47 ^a	1,66±0,16 ^a	1,68±0,13 ^b

* Média dos Inóculos: A13P3: 7,88±0,56 log UFC/ml; CC: 8,05±0,00g UFC/ml; CC: 8,25±0,14 log UFC/ml

**Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise individual de cada uma das cepas frente aos tratamentos com solução de HCl em diferentes pH em função do tempo demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa nas reduções das contagens da cepa A13P3 em nenhum dos tempos testados para cada um dos pH avaliados exceto para o pH 2.0. No pH 2.0 a redução das contagens da cepa A13P3 aumentou significativamente na medida em que o tempo de exposição aumentou, variando de 1,45±1,10 logUFC/ml em t=0, para 2,75 ± 0,50 log UFC/ml após 3 minutos de exposição. Os resultados da análise individual dos tratamentos com ácido clorídrico para a cepa CC demonstraram que a mesma não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos tempos testados em todos os pH avaliados. A cepa ATCC8739, no entanto, apresentou o comportamento variável em relação aos tempos e pH avaliados quando confrontada com soluções de HCl em diferentes pH, sendo que, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas para no pH 2.0 e pH4.5 (Tabela 5).

A análise individual de cada uma das cepas frente aos tratamentos com solução de ácido propiônico (AP) em diferentes pH demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa nas reduções das contagens das cepas A13P3 e CC em nenhum dos tempos testados para cada um dos pH avaliados. Para a CC houve diferenças significativas em função dos tempos de exposição no pH 3.5, pH 6.5 e pH 9.5.

Comparando a ação dos tratamentos, em relação ao tempo de contato, observa-se que dentre todos os tratamentos o AP pH 2.0 foi o mais efetivo na redução das contagens da cepa A13P3. Para os demais tratamentos, HCl pH 2.0 a partir dos tempos 1 e 2 apresentou redução de 2,45 logUFC/ml, sendo que a redução nestes tempos foi estatisticamente igual, mas já significativamente maior do que a redução dos demais tratamentos para os mesmos tempos. Após 3 minutos de exposição a redução da A13P3 devido a exposição ao HCl pH 2.0 foi igual a 2,75 logUFC/ml valor significativamente maior em relação aos tempos anteriores. No entanto, para o mesmo tempo de exposição a redução obtida pela exposição ao pH 2.0 obtido através do ácido propiônico foram aproximadamente três vezes melhores do que as reduções obtidas pelo HCl pH 2.0.

Na análise da ação dos tratamentos em relação ao tempo de contato observa-se que para a cepa ATCC8739 o tratamento mais efetivo foi o AP pH 2.0 quando comparado com os demais tratamentos. Este comportamento foi observado para todos os tempos analisados. A redução obtida após 3 minutos de exposição ao HCl pH 2.0 foi significativamente maior do que as reduções

obtidas com 2 minutos de exposição, porém ainda aproximadamente quatro vezes menor do que as redução do ácido propiônico.

O tratamento AP pH 2.0 também foi o mais efetivo na redução da cepa CC, com reduções significativas quando comparadas aos outros tratamentos, resultado observado para todos os tempos analisados.

No tempo 2 do HCl pH2.0 a redução nas contagens da cepa CC foi significativamente menor quando comparada a redução obtida pelo AP pH 2.0 no mesmo tempo de exposição. Nesse tempo a redução também foi equivalente as reduções obtidas pelos tratamentos HCl pH 9.5 e AP pH 9.5. Após 3 minutos de exposição, no entanto, a redução foi significativamente maior quando comparada com as reduções obtidas nos demais tratamentos, no entanto ainda foi aproximadamente quatro vezes menor em relação ao AP pH 2.0 com 3 minutos de exposição. Esses resultados indicam que as cepas A13P3, ATCC8739 e CC foram mais sensíveis aos tratamentos mais ácidos e mais básicos.

Ao comparar o comportamento das três cepas entre si, frente ao HCl pH 2.0, para 2 minutos de exposição houve diferenças significativas nas reduções das três cepas. A mais sensível foi a A13P3, em seguida a CC e ATCC8739 a menos sensível com reduções de 2,45 log UFC/g, 2,01 log UFC/g e 1,53 log UFC/g respectivamente, exceto, após 3 minutos de exposição neste pH as A13P3 continuou sendo a mais sensível enquanto a CC e ATCC8739 demonstraram comportamento equivalente.

Para o tratamento HCl pH 3.5 após três minutos de exposição de acordo com análise estatística dos resultados a A13P3 demonstrou ser menos

sensível do que a ATCC8739 e CC, sendo que de 0 a 2 minutos a A13P3 e a CC apresentaram reduções estatisticamente iguais. Para os tratamentos com solução acidificada com HCl até pH final de 4.5, 6.5 e 9.5 a sensibilidade das três cepas foi a mesma em todos os tempos de exposição.

Para os tempos 0, 1 e 3 minutos as reduções obtidas para as três cepas no tratamento AP pH 3.5 foram equivalentes, o único tempo em que houve diferenças significativas entre as cepas foi no tempo 2 em a CC foi mais sensível quando comparada com a ATCC8739. No tratamento AP4.5 a cepa A13P3 foi a mais resistente em todos os tempos analisados, quanto a ATCC8739 e CC apresentaram comportamento igual estatisticamente em todos os tempos.

Para o tratamento AP pH 6.5 as três cepas tiveram reduções equivalentes apresentando a mesma sensibilidade em todos os tempos de exposição, enquanto, para os tempos 0, 1 e 3 minutos as reduções obtidas pelo tratamento AP pH 9.5 para as três cepas foram equivalentes. No tratamento com AP pH 9.5 único tempo em que houve diferenças significativas entre as cepas foi no tempo 2 em a CC foi mais sensível quando comparada com a ATCC8739.

Apesar dos resultados demonstrarem que todos os tratamentos reduziram as contagens, com exceção do tratamento AP pH 2.0 que proporcionou a inativação total do inóculo inicial para as três cepas, nos demais tratamentos as reduções variaram de 1 a 2 log UFC/g o que representa uma redução inferior a 30% em relação aos respectivos inóculos iniciais. Esses

resultados demonstram que apesar das reduções, as cepas de *E. coli* estudadas foram capazes de sobreviver em pH que variaram de 2,0 a 9,5.

Vários estudos têm demonstrado que a *E. coli* O157:H7, tem uma multiplicação ótima em pH de próximo a neutralidade, no entanto as mesmas são capazes de se multiplicar numa gama de pH que vai de 4,5 e 9,0 (GLASS et al, 1992; DINEEN et al, 1998).

O pH mínimo para a multiplicação de *E. coli* O157:H7 está entre 4,0 e 4,5 (BUCHAMAN & BAGI, 1994), no entanto, algumas cepas de *E. coli* O157:H7 são capazes de resistir até valores de pH baixos incluindo pH 3.0 (JORDAN et al, 1999). A adaptação ácida pode variar em função da interação do pH com outras características de multiplicação, por exemplo, um estresse adicional aumenta o pH para multiplicação e o tipo de ácido (ex. orgânico ou inorgânico) e sua concentração no meio (ABDUL-RAOUF et al, 1993).

Quando alguns microrganismos, como no caso das *E. coli*, são colocados em meios com pH abaixo ou acima da neutralidade, sua capacidade de proliferar depende da capacidade de modificar o pH do meio para um valor ou faixa ótima (JAY, 2005).

Segundo Jay (2005) apud Chung e Goepfert (1970), alguns microrganismos tem a capacidade de alterar o meio externo para condições mais favoráveis, no caso de ácidos como o clorídrico e cítrico, o que não acontece para os ácidos acéticos e propiônico. Ácidos orgânicos fracos como o ácido acético e propiônico são conservantes comuns em alimentos pois inibem multiplicação bacteriana e fúngica. Em solução conservante do tipo ácidos fracos existem em equilíbrio dependente do pH, nas formas dissociada e não

dissociada. Esses conservantes tem uma atividade ótima de inibição em pHs baixos em razão da maior concentração da forma sem carga (não dissociada). Essa forma de ácido é livremente permeável através da membrana plasmática e dentro da célula a dissociação ocorre devido ao pH próximo da neutralidade, resultando em geração e acumulação de ânions e cátions. Conseqüentemente a inibição da multiplicação bacteriana pode ser devida a vários fatores, como, por exemplo rompimento da função da membrana e inibição de reações metabólicas essenciais (EKLUND, 1985; BRACEY et al, 1998)

Este comportamento foi observado no presente estudo para as três cepas estudadas. As reduções obtidas após três minutos de exposição a solução de TSBm acidificado com ácido clorídrico pH 2,0 foram de $2,75 \pm 0,50$ logUFC/ml para a A13P3, $2,16 \pm 0,39$ logUFC/ml para a CC e $2,10 \pm 0,46$ logUFC/ml a ATCC8739. Por outro lado, para o mesmo pH obtido pela acidificação do TSBm com ácido propiônico foi capaz de inativar totalmente todas as cepas a partir do tempo zero.

A sobrevivência da *E. coli* O157:H7 em alimentos ácidos é particularmente importante, pois pode promover uma maior sobrevivência de *E. coli* O157: H7 durante a passagem através do ambiente ácido do estômago (LEYER et al, 1995; JORDAN et al, 1999) e muitos surtos são associados com a capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 nestes alimentos.

Segundo vários pesquisadores, o alto grau de tolerância à acidez e secagem (GLASS et al, 1992; LIN et al, 1996; TILDEN et al, 1996) garante a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em alimentos previamente considerados seguros (FENG, 1995; PATON et al, 1996).

Foi constatado experimentalmente, que a *E. Coli* O157:H7 sobrevive de semanas a meses, em uma variedade de alimentos ácidos, incluindo maionese (ZHAO & DOYLE, 1994), salsichas (CLAVERO & BEUCHAT, 1996), cidra de maçã (ZHAO et al, 1993), queijo cheddar (REITSMA & HENNING, 1996) e iogurte (BASTOS, 2009).

Segundo Berry e Cutter (2000), *E. coli* O157:H7 é considerado um dos sorovares mais ácido resistentes, o que vai de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, a tolerância ácida foi observada para as três cepas estudadas. Gordon and Small (1993) relataram que *E. coli* enteroinvasivas e enteropatogênicas são significativamente mais ácido tolerantes do que as cepas não patogênicas, no presente estudo foram analisadas três cepas patogênicas, sendo duas cepas de *E. coli* O157:H7 citotóxicas para células Vero e positivas para pelo menos uma Stx, e uma cepa de *E. coli* ATCC 7839, patogênica aviária, isolada do pulmão de um frango com colisepticemia (BACMAP, 2014), todas se mostraram ácido resistentes sobrevivendo a todos os pH analisados, com exceção do tratamento AP pH 2.0.

A adaptação das células bacterianas no trato gastrintestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido resistência (BASTOS, 2009) e a indução da tolerância a ácido em *E. coli* pode aumentar sua sobrevivência em alimentos ácidos (CHEVILLE et al, 1996). Não obstante, a *E. coli* O157:H7 pode se adaptar a condições moderadamente ácidas, que lhe confere resistência ao ácido sob condições ácidas subsequentes letais (<pH 4,5) (SEPUTIENE et al, 2005).

Esses resultados demonstram que as cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC diferiram muito pouco em relação a resistência ácida e, apesar de algumas pequenas diferenças observadas de modo geral, ambas resistiram bem aos tratamentos ácidos a exceção do AP pH 2,0. A cepa ATCC8739 apresentou comportamento semelhante ao observado para as cepas A13P3 e CC, demonstrando que as cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas no sul do Brasil não apresentaram resistência ácida maior que o controle utilizado.

5.2.1. Resistência de *E. coli* O157:H7 frente a diferentes desinfetantes

A seguir são apresentados os resultados da avaliação da resistência a diferentes desinfetantes de duas cepas de *E. coli*. Nesse experimento foram submetidas aos tratamentos as cepas *E. coli* O157:H7 A13P3 e a cepa ATCC8739. Foram testados um desinfetante clorado (dicloroisocianurato) identificado como desinfetante A, um ácido orgânico (ácido láctico e ácido cítrico), desinfetante B e um desinfetante do grupo quaternário de amônio (cloreto de benzalcônio), desinfetante C.

Todos os desinfetantes foram testados na concentração recomendada pelo fabricante (F), na metade da concentração recomendada (F/2), um quarto da recomendação (F/4) e duas vezes o recomendado (2F). O álcool etílico foi utilizado puro (96GL) e diluído a 70%. Todos os testes foram conduzidos em presença de matéria orgânica (1% de albumina bovina).

As Tabelas 7 a 21, apresentam as reduções obtidas por cada tratamento em função do tempo expressas em logUFC/g. As médias das reduções foram calculadas com base nos valores dos inóculos.

Para realização dos testes de resistência foi utilizado como fonte de diclorocianurato, desinfetante A, utilizado comumente por serviços de alimentação conforme recomendações contidas no rótulo do produto. O produto é apresentado em pó, e utilizado na concentração de 2 g/L (130 ppm de cloro residual).

Os resultados indicaram que não houve redução significativa da *E. coli* O157:H7 A13P3, nas concentrações e tempos testados para o dicloroisocianurato de sódio, exceto quando foi utilizado o dobro da concentração recomendada pelo fabricante (aproximadamente 260 ppm) (Tabela 7). Por outro lado, as contagens de *E. coli* ATCC8739 foram reduzidas em 0,89 logUFC/g após 3 minutos de exposição a 130 ppm de dicloroisocianurato de sódio. Reduções de 5,54 logUFC/g foram observadas depois de 5 minutos de exposição a este desinfetante.

Concentrações de aproximadamente 65 ppm (F/2) e 30 ppm (F/4) não reduziram significativamente as contagens da cepa ATCC. Os demonstraram também que a cepa de *E. coli* O157:H7 A13P3 foi mais resistente ao dicloroisocianurato de sódio do que a *E. coli* ATCC 8739 (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. Reduções logarítmicas da *E. coli* O157:H7 A13P3 frente ao dicloroisocianurato (desinfetante A) em diferentes concentrações.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/4	F/2	F	2F
0	0,24 ± 0,08	0,30 ± 0,05	0,31 ± 0,05	5,40 ± 0,03
3	0,43 ± 0,11	0,41 ± 0,12	0,33 ± 0,03	5,40 ± 0,03
5	0,31 ± 0,06	0,37 ± 0,10	0,33 ± 0,08	5,40 ± 0,03
10	0,41 ± 0,22	0,37 ± 0,16	0,27 ± 0,11	5,40 ± 0,03
15	0,35 ± 0,10	0,37 ± 0,18	0,25 ± 0,08	5,40 ± 0,03

20	0,31 ± 0,05	0,32 ± 0,13	0,29 ± 0,01	5,40 ± 0,03
25	0,37 ± 0,09	0,27 ± 0,09	0,30 ± 0,04	5,40 ± 0,03
30	0,28 ± 0,15	0,33 ± 0,13	0,27 ± 0,03	5,40 ± 0,03
45	0,39 ± 0,18	0,28 ± 0,11	0,31 ± 0,05	5,40 ± 0,03

*Média do inóculo: 5,40 logUFC/ml

Tabela 8. Médias das reduções logarítmicas da *E. coli* ATCC8739 frente ao dicloroisocianurato (desinfetante A) em diferentes concentrações.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/4	F/2	F	2F
0	0,16 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,39 ± 0,02	5,54 ± 0,11
3	0,16 ± 0,01	0,39 ± 0,08	0,89 ± 0,02	5,54 ± 0,11
5	0,16 ± 0,01	0,36 ± 0,02	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
10	0,16 ± 0,01	0,37 ± 0,05	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
15	0,16 ± 0,01	0,37 ± 0,07	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
20	0,16 ± 0,01	0,38 ± 0,02	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
25	0,16 ± 0,01	0,43 ± 0,03	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
30	0,16 ± 0,01	0,39 ± 0,02	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11
45	0,16 ± 0,01	0,39 ± 0,02	5,54 ± 0,11	5,54 ± 0,11

*Média do inóculo: 5,54 logUFC/ml

O desinfetante comercial B, cujo princípio ativo é um ácido orgânico, produto destinado a desinfecção de laticínios, indústrias farmacêuticas e indústrias de alimentos em geral. O produto é comercializado na forma líquida com recomendação de uso de 0,5 a 1,0%. Os resultados demonstraram que quando utilizadas as concentrações recomendadas pelo fabricante, aqui considerada 1,0% o produto foi capaz de reduzir por completo as contagens a partir de 3 minutos de contato, a recomendação do fabricante indica tempo mínimo de 10 a 15 minutos. As Tabelas 9 e 10 trazem os resultados das reduções das contagens de *E. coli* O157:H7A13P3 frente ao ácido orgânico (desinfetante B) em diferentes concentrações em função do tempo. O desinfetante comercial B, cujo princípio ativo é um ácido orgânico, produto destinado à desinfecção de laticínios, indústrias farmacêuticas e indústrias de

alimentos em geral. O produto é comercializado na forma líquida com recomendação de uso de 0,5 a 1,0%.

Tabela 9. Reduções logarítmicas da *E. coli* O157:H7A13P3 frente ao ácido orgânico (desinfetante B) em diferentes concentrações em função do tempo.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/4	F/2	F	2F
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,19 ± 0,13	6,58 ± 0,21
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
15	1,14 ± 0,18	3,14 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
20	2,54 ± 0,15	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
25	3,28 ± 0,09	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
30	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21
45	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21	6,58 ± 0,21

*Média inóculo: A13P3 6,58 logUFC/ml

Tabela 10. Reduções logarítmicas da *E. coli* ATCC8739 frente ao ácido orgânico (desinfetante B) em diferentes concentrações em função do tempo.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/4	F/2	F	2F
0	0,00 ± 0,00	1,16 ± 0,10	2,22 ± 0,13	6,74 ± 0,08
3	0,00 ± 0,00	2,08 ± 0,13	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
5	1,18 ± 0,11	2,51 ± 0,26	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
10	2,61 ± 0,12	3,39 ± 0,44	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
15	3,20 ± 0,21	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
20	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
25	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
30	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08
45	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08	6,74 ± 0,08

*inóculo: STE 6,74 logUFC/ml

Os resultados demonstraram que quando utilizadas as concentrações recomendadas pelo fabricante, aqui considerada 1,0% o produto foi capaz de reduzir por completo as contagens a partir de 3 minutos de contato, a recomendação do fabricante indica tempo mínimo de 10 a 15

minutos. Tendo em vista que na concentração de 0,5% (mínima recomendada) o produto demonstrou-se capaz de reduzir as contagens da ATCC8739 apenas após 15 minutos de exposição, enquanto para a cepa de *E. coli* O157:H7 A13P3 foram necessários 20 minutos para a redução total das contagens. Quando confrontadas com a diluição de 0,25% as reduções mais expressivas foram observadas nos tempos de 20 e 30 minutos para as cepas STE e A13P3 respectivamente. Esses resultados demonstram que a cepa de *E. coli* O157:H7 A13P3 foi mais resistente para concentrações inferiores a 1%.

Os experimentos foram conduzidos em presença de matéria orgânica, a fim de simular as condições encontradas *in loco* nas indústrias de alimentos. Jaenisch et al (2010) em estudo a fim de avaliar a atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves observaram que presença da matéria orgânica reduziu a atividade antibacteriana nos desinfetantes à base de ácidos orgânicos (cítrico, percético, láctico), produtos que detêm a característica de serem biodegradáveis.

Para o teste com álcool etílico foi utilizado álcool puro na forma líquida com concentração de 96GL. O produto foi testado puro e diluído na concentração de 70%. As concentrações testadas foram escolhidas em função do uso frequente em indústrias de alimentos e principalmente serviços de alimentação. A recomendação de concentração uso do produto como desinfetante é de 70% (SES-RS, 2010), no entanto o produto foi testado puro, pois frequentemente o manipulador de alimentos não dilui o produto. Os resultados demonstraram que quando confrontadas com álcool etílico a 70% e

96%, ambas as cepas foram totalmente reduzidas em todos os tempos testados (Tabela 11).

Tabela 11. Reduções logarítmicas da *E. coli* ATCC8739 frente ao álcool etílico em diferentes concentrações em função do tempo.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	A13P3		ATCC8739	
	70%	96%	70%	96%
0	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
3	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
5	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
10	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
15	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
20	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
25	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
30	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09
45	6,95 ± 0,12	6,95 ± 0,12	6,30 ± 0,09	6,30 ± 0,09

*inóculo: A13P3 6,95 logUFC/ml; ATCC8739 6,30 logUFC/ml

O cloreto de benzalcônio é utilizado como desinfetante pela indústria de alimentos em geral. O desinfetante comercial C, utilizado nesse estudo, é um produto a base de cloreto de benzalcônio comercializado na forma líquida com 22% de princípio ativo. A recomendação de uso segundo o rótulo do fabricante é uma diluição de 2%(v/v) (4400 ppm), uso em temperatura ambiente e necessita de enxague. Os resultados demonstraram que o produto foi eficaz na redução das contagens de ambas as cepas em todos os tempos e concentrações avaliados (tabelas 12 e 13). Grezzi (2007) reportou que desinfetantes à base de amônia quaternária são bastante sensíveis à presença de matéria orgânica, o produto avaliado no presente estudo, no entanto, demonstrou ser eficiente mesmo na presença de matéria orgânica.

Tabela 12. Médias das reduções logarítmicas da *E. coli* O157A 13P3 frente ao cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações em função do tempo.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/2	F/4	F	2F
0	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
3	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
5	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
10	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
15	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
20	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
25	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
30	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03
45	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03	6,40 ± 0,03

*inóculo (média): A13P3 6,40 logUFC/ml

**Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 13. Médias das reduções logarítmicas da *E. coli* ATCC8739 frente ao cloreto de benzalcônio em diferentes concentrações em função do tempo.

Tempo de Exposição (min)	Médias das contagens e concentração do desinfetante			
	F/2	F/4	F	2F
0	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
3	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
5	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
10	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
20	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
25	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
30	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15
45	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15	7,54 ± 0,15

*inóculo (média): 7,54 logUFC/ml

Com base nos resultados apresentados pode-se dizer que a cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 foi mais resistente do que a cepa controla ATCC8739 quando confrontadas com o dicloroisocianurato e desinfetante a

base de ácido orgânico. Não houve diferenças significativas, no entanto quando as cepas foram expostas ao álcool etílico e cloreto de benzalcônio em todos os tempos e concentrações avaliados.

5.2.2. Avaliação dos processos de lavagem e desinfecção de alfaces contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7

A realização deste ensaio teve o objetivo de avaliar diferentes métodos higienização de alfaces artificialmente contaminadas com *E. coli* O157:H7, uma vez que esse vegetal é consumido “*in natura*”, o que contribui para transmissão de DTA.

Para avaliação da eficácia dos diferentes tratamentos a contaminação artificial da alface utilizada uma cepa de *E. coli* O157:H7, denominada CC, isolada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos – UFRGS a partir de uma amostra de água de enxague utilizada no processamento de alfaces em uma pequena propriedade de produção orgânica do sul do Brasil.

Ao todo foram avaliados onze tratamentos e os resultados demonstraram que todos os tratamentos (T1 a T11) reduziram as contagens de *E. coli* O157:H7 (CC) das alfaces artificialmente contaminadas. Na Figura 12 observa-se que a redução média (total) obtida para as contagens de mesófilos totais (MT) ficou em torno de $2,72 \pm 0,56$ log UFC/g enquanto a redução média (total) para as contagens da cepa CC foi de $2,97 \pm 1,21$ logUFC/g.

Comparando-se as médias das reduções observa-se uma pequena diferença entre as contagens de MT e da cepa CC. Uma possível explicação para essa diferença se deve ao fato de que a flora acompanhante, presente naturalmente na alface, ser mais resistente que *E. coli* O157:H7, o que resultou

em reduções menores nas contagens de MT. Este fato foi observado em alguns tratamentos onde a flora acompanhante claramente apresentou-se mais resistente, por exemplo, o tratamento T7 (Figura 1), onde a redução das contagens de *E. coli* O157:H7 foi 2,80 logUFC/g maior do que a redução observada na quantificação de microrganismo mesófilos totais.

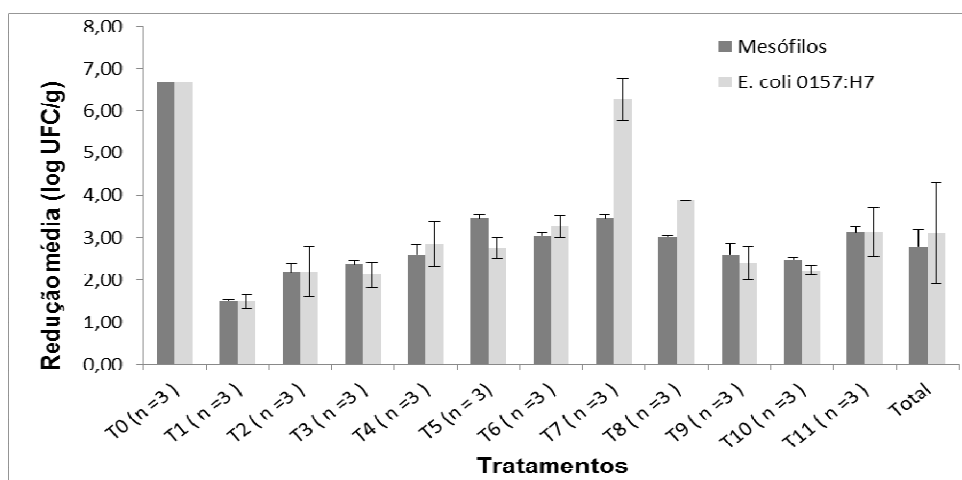


Figura 1. Reduções médias das contagens de Mesófilos totais e *Escherichia coli* O157:H7 (CC) em alface artificialmente contaminada submetida a diferentes tratamentos. T0 - Controle sem tratamento; T1- Lavagem com água potável (30s); T2- Lavagem com água potável (30s) e imersão em água tratada por 15 minutos; T3- Lavagem com água potável (30s) e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, com 50 ppm de cloro residual, por 15 minutos; T4- Lavagem com água potável (30s) e posteriormente em hipoclorito de sódio a 2,5%, com cloro ativo de 200 ppm, por 15 minutos; T5- Lavagem com água potável (30s) e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, com cloro ativo de 200 ppm, por 5 minutos; T6- Lavagem com água potável (30s) e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, com cloro ativo de 200 ppm, por 1 minutos; T7- Lavagem com água potável (30s) e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, com cloro ativo de 200 ppm, por 15 minutos/10°C; T8- Lavagem com água potável (30s) e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, com cloro ativo de 130 ppm, por 15 minutos (sanitizante comercial A); T9 - Lavagem com água potável (30s) e posteriormente imersão em solução de vinagre a 2% por 15 minutos; T10- Lavagem com água potável (30s) e imersão em solução de ácido peracético 200ppm por 15 minutos. T11- Lavagem com água potável (30s) e imersão em dicloroisocianurato de sódio, com cloro ativo de 200 ppm, por 15 minutos (sanitizante comercial B). Os tratamentos T3 a T11 passaram por enxague com água potável (30s) após a desinfecção

Na Tabela 14, estão descritos os valores médios de redução e respectivos desvios obtidos após a aplicação dos diferentes tratamentos aplicados. A Tabela apresenta ainda as reduções obtidas pela ação isolada dos desinfetantes calculada a partir da média das reduções do tratamento descontadas das reduções referentes a etapa de lavagem, conforme fórmula descrita no item 5.4.4.6.

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão das reduções de mesófilos e *E. coli* 0157:H7, em alface artificialmente contaminada, submetida a diferentes tratamentos.

	Mesófilos		<i>E. coli</i> 0157:H7	
	Redução do Tratamento (log UFC/g)	Redução por desinfecção* (log UFC/g)	Redução do Tratamento (log UFC/g)	Redução por desinfecção* (log UFC/g)
T0	-	-	-	-
T1	1,50 ± 0,04 ^{cd}	-	1,49 ± 0,18 ^{gh}	-
T2	2,19 ± 0,20 ^a	-	2,21 ± 0,59 ^g	-
T3	2,38 ± 0,09 ^a	0,88 ± 0,09 ^a	2,13 ± 0,30 ^f	0,64 ± 0,30 ^f
T4	2,59 ± 0,26 ^{abc}	1,09 ± 0,26 ^{abc}	2,86 ± 0,54 ^{gh}	1,37 ± 0,54 ^{gh}
T5	3,47 ± 0,09 ^{bcd}	1,97 ± 0,09 ^{bcd}	2,76 ± 0,26 ^{gh}	1,27 ± 0,26 ^{gh}
T6	3,05 ± 0,06 ^{de}	1,55 ± 0,06 ^{de}	3,27 ± 0,27 ^{gh}	1,78 ± 0,27 ^{gh}
T7	3,47 ± 0,09 ^e	1,97 ± 0,09 ^e	6,27 ± 0,50 ⁱ	4,78 ± 0,50 ⁱ
T8	3,03 ± 0,03 ^d	1,53 ± 0,03 ^d	3,88 ± 0,01 ^h	2,39 ± 0,01 ^h
T9	2,59 ± 0,28 ^{ab}	1,09 ± 0,28 ^{ab}	2,40 ± 0,39 ^g	0,91 ± 0,39 ^g
T10	2,47 ± 0,05 ^{ab}	0,97 ± 0,05 ^{ab}	2,23 ± 0,12 ^g	0,74 ± 0,12 ^g
T11	3,13 ± 0,13 ^{de}	1,63 ± 0,13 ^{de}	3,13 ± 0,57 ^{gh}	1,64 ± 0,57 ^{gh}

* Ação isolada do desinfetante

** Médias não seguidas pela mesma letra minúscula na vertical diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise estatística através do teste de comparação de médias de Tukey demonstrou que existem diferenças significativas entre alguns tratamentos, enquanto outros são equivalentes. O hipoclorito de sódio é um dos principais sanitizantes utilizados para a desinfecção de alimentos no ambiente doméstico, em indústrias e serviços de alimentação (GUNDUZ; GONUL; KARAPINAR, 2010; GE; LIE; LIE, 2012), pois normalmente apresenta

baixo custo e ação rápida. Neste trabalho foram testados água sanitária, sanificante mais frequente no uso doméstico e muito utilizado em serviços de alimentação e os dois saneantes de comerciais (A e B) de uso institucional mais utilizado pelos serviços de alimentação e indústrias de vegetais minimamente processados do RS.

Comparando reduções médias de *E. coli* O157:H7 as maiores reduções foram observadas nos tratamentos T7 ($6,27 \pm 0,50$ logUFC/g) e T8 ($3,88 \pm 0,01$ logUFC/g), respectivamente. Os resultados demonstraram que as reduções obtidas nos tratamentos que utilizam solução clorada T4, T5, T6, T8 e T11, não tiveram diferença estatística entre si, com exceção de T7 que apresentou melhor desempenho em relação a todos os demais tratamentos.

A legislação brasileira estabelece que, quando aplicável, os alimentos a serem consumidos crus devem ser submetidos a processo de higienização a fim de reduzir a contaminação superficial. Os produtos utilizados na higienização dos alimentos devem estar regularizados no órgão competente do Ministério da Saúde e serem aplicados de forma a evitar a presença de resíduos no alimento preparado (Brasil, 2004). No RS, a legislação estadual, para Serviços de Alimentação recomenda que produtos consumidos crus sejam higienizados e recomenda que a etapa de desinfecção seja realizada com o uso de solução clorada contendo no mínimo 100 e no máximo 250 ppm de cloro livre e tempo de contato de 15 minutos, ou através de produtos específicos registrados em órgão competente da ANVISA (SES-RS, 2009). Já a legislação do Estado de SP, diz que a higienização de hortifrutícolas deve ser feita com água potável e produtos desinfetantes para uso em alimentos,

regularizados na ANVISA, atendendo as instruções recomendadas pelo fabricante, e quando usada solução clorada o tempo de contato deve ser de 15 a 30 minutos e recomenda diluições para a solução clorada desinfetante de 10ml/L de hipoclorito de sódio 2,5% ou 20ml/L de hipoclorito de sódio 1,0% (CVS-5, 2013). No entanto, seja a federal ou as de âmbito estadual, nenhuma faz alusão a temperatura de uso do desinfetante.

A temperatura, no entanto, teve ação significativa sobre a ação do desinfetante na redução das contagens de *E. coli* O157:H7. Essa relação foi observada comparando-se os resultados dos tratamentos T4 e T7. A solução desinfetante utilizada no tratamento T7 foi exatamente a mesma utilizada no T4, diferindo apenas pela temperatura do desinfetante. A solução T7 a foi mantida a 10°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), durante o tempo de imersão da alface na solução, enquanto o tratamento T4 foi conduzido a temperatura ambiente ($26\pm 2^\circ\text{C}$). Essa diferença de temperatura utilizada entre os tratamentos provocou, portanto, um aumento na ação do desinfetante de um tratamento para o outro e, com isso, as reduções da constagens de *E. coli* O157:H7 e de mesófilos praticamente o dobraram (Tabela 22).

Segundo Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas (2013) várias concentrações de hipoclorito estão sendo utilizadas para a desinfecção de superfícies e alimentos. As indicações normalmente variam 50 a 200 ppm (GUNDUZ & GONUL; KARAPINAR, 2010; GE & LIE, 2012) em imersão durante um período de 15 a 30 minutos.

Estudo realizado por Oliveira et al (2012) demonstrou que os tratamentos que utilizaram hipoclorito de sódio a 200 ppm durante 15 e 30

minutos foram os mais eficazes na redução de microrganismos mesófilos com 2,06 e 2,46 log respectivamente, e coliformes totais de 2,29 e 2,35 log. Apesar dos valores de redução um pouco menores, esses resultados vão ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo, onde os tratamentos a base de hipoclorito a excessão de T7, reduziram em média $3,05 \pm 0,28$ logUFC/g a contagem de mesófilos totais e $3,18 \pm 0,39$ logUFC/g as contagens de *E.coli* O157:H7 (coliforme fecal), no entanto a análise estatística não demonstrou relação significativa para as variações nos tempos de exposição.

Uma vez que os tratamentos T4, T5, T6, T8 e T11 apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si, os tratamentos onde a desinfecção se deu pelo uso de compostos a base de cloro foram os mais eficientes na redução da *E. coli* O157:H7. Essa redução foi independente do tempo de contato (1, 5, ou 15 minutos) e da fonte de cloro livre (água sanitária 2,5%, dicloro-isocianurato (sanitizante comercial A) e hipoclorito (sanitizante comercial B).

O desempenho dos tratamentos T1 e T2, onde não foi realizado o uso de desinfetante, apresentou resultado estatisticamente igual aos tratamentos com desinfecção por solução clorada na redução de *E. coli* O157:H7. Na contagem de mesófilos, T1 foi significativamente menos eficiente do que os tratamentos T2 e T3. Esse resultado positivo em relação a redução da contaminação da *E. coli* O157:H7 obtida apenas pela etapa de limpeza (T1 e T2) é de extrema importância, pois, embora seja recomendado que essas verduras sejam submetidas a métodos de lavagem e desinfecção, comumente o manipulador utiliza apenas a lavagem com água.

Contudo, a etapa de desinfecção não deve ser dispensada, pois apesar diferença entre as contagens não ter sido significativa estatisticamente, as reduções obtidas pela ação isolada dos desinfetantes ficaram em média na casa de 1,7 log UFC/g. Considerando a baixa dose infectiva da *E. coli* 0157:H7 essa diferença, pode ser determinante na prevenção dos surtos alimentares.

Além disso, embora a água possa ser uma ferramenta útil para reduzir a contaminação, também pode introduzir ou difundir contaminantes, especialmente se for reutilizada, o que justifica a necessidade da manutenção da qualidade da água de processamento. Na verdade, apesar da idéia geral de que os sanitizantes são usados para reduzir a população microbiana do produto, o seu efeito principal é a manutenção da qualidade microbiológica da água (LÓPEZ-GÁLVEZ et al, 2009). Desta forma, a utilização de água potável, em vez de água contendo agentes de desinfecção química para lavar hortaliças minimamente processadas vem sendo defendida em alguns países europeus (SELMA et al, 2009).

A indústria de vegetais minimamente processados usa cloro como um dos desinfetantes mais eficazes para garantir a segurança de seus produtos. No entanto, há uma tendência para a eliminação do cloro dos processo de desinfecção por causa das preocupações sobre a sua eficácia e em função dos riscos ambientais e de saúde associados com a formação, durante a desinfecção, de sub-produtos halogenados potencialmente carcinogênicos (ÖLMEZ & KRETZSCHMAR, 2009) .

Apesar dos produtos à base de cloro continuarem sendo os mais utilizados, têm-se buscado de alternativas de sanitizantes que garantam a

qualidade e segurança do produto, entre esses destacam-se os ácidos orgânicos ácido acético e o ácido peracético, amplamente utilizados por serem considerados tão ou mais eficazes do que esses compostos (AKBAS et al, 2007, SELMA et al, 2009).

De acordo com Fang & Hsueh (2000), os ácidos orgânicos incluem ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, e ácido cítrico, e são naturalmente encontrados em uma variedade de frutas e alimentos fermentados. Desses, destaca-se como principal substância o vinagre (ácido acético), sendo este amplamente estudado quanto a sua eficácia na remoção de microrganismos patogênicos de frutas e vegetais frescos.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o vinagre é capaz de diminuir a quantidade de microrganismos em alimentos (incluindo vegetais) e também em superfícies (BELL, CUTTER, SUMNER, 1997; KARAPINAR & GONUL, 1992; TORRIANI, ORSI, VESCOVO, 1997), devido ao seu mecanismo de ação que ao diminuir o pH inativa as enzimas, realiza funções na membrana e na atividade metabólica no transporte de nutrientes (CHANG & FANG, 2007; OLMEZ & KRETZSCHMAR, 2009). Além disso, a maioria dos ácidos orgânicos são protonados, o que facilita sua entrada nas células e conseqüentemente leva a morte celular dos microrganismos (CHANG & FANG, 2007).

Nesse trabalho, os tratamentos T9 e T10 referem-se ao uso de ácido acético (vinagre) e ácido peracético respectivamente. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre estes dois tratamentos. Quando comparados com os tratamentos utilizando desinfetante a

base de cloro demonstram ser tão eficientes quanto, apresentando reduções na mesma ordem de grandeza, sendo superados apenas pelo tratamento T7. Esse resultado demonstra que o uso do ácido acético e peracético poderiam ser uma alternativa ao tratamento tradicional com solução clorada para a indústria de alimentos em geral e, especialmente, para os produtores de produtos orgânicos, em geral contrários ao uso do cloro.

Segundo o estudo de Chang & Fang (2007) o vinagre na concentração de 5% foi capaz de reduzir em 4 Log UFC/g de *Escherichia coli* O157:H7 aderidas em folhas de alface. Já na pesquisa realizada por Oliveira et al (2012) o vinagre na concentração de 20% foi capaz de reduzir 2,09 Log UFC/g da a contaminação por coliformes totais nas alfaces coletadas em serviços de alimentação de Porto Alegre-RS. No presente estudo a concentração testada para o vinagre foi de 2% e as reduções obtidas para as contagens de mesófilos totais e *E. coli* O157:H7 foram de $2,59 \pm 0,28$ log UFC/g e $2,40 \pm 0,39$ log UFC/g respectivamente.

O solo, ambiente natural dos hortifrutís, é por natureza um meio ambiente contaminado e, após a colheita, estes alimentos apresentam uma série de microrganismos patogênicos capazes de causar doenças humanas (OLMEZ & KRETZSCHMAR, 2009; NASCIMENTO, et al, 2003). Uma vez que frutas e vegetais podem ser contaminados por diversas fontes além do solo, como contato com dejetos de animais contaminados, poeira, água de irrigação, e esterco tratado inadequadamente, *E. coli* O157:H7 passa a ser uma preocupação nestes produtos (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2011; WARRINER, 2012; RODRIGUES et al, 2014).

A fácil aquisição, o sabor, a qualidade nutritiva e o fato de ser uma hortaliça de baixo custo fazem da alface (*Lactuca sativa* L, *cichoraceae*) a hortaliça folhosa mais consumida no país e no mundo (ABREU et al, 2010).

Vários surtos de DTA causados por *Escherichia coli* O157:H7 têm sido associados com o consumo alface minimamente procesada (DELAQUIS et al, 2002; LYNCH et al, 2009).

Segundo dados do CDC (2014), 58 pessoas foram infectadas com *E. coli* O157: H7 em um surto envolvendo alface contaminada. O surto ocorreu no período compreendido entre os meses de outubro e novembro de 2011, acometendo pessoas com idades de 1 a 94 anos, com uma idade mediana de 28 anos, abrangendo nove estados americanos. Cinquenta e nove por cento dos acometidos eram do sexo feminino. Entre os doentes dos 49 com a informação disponível, 33 (67%) foram hospitalizadas e três desenvolveram a síndrome hemolítico-urêmica (SHU), não houve óbitos.

No entanto, diversos métodos têm sido recomendados para reduzir a quantidade de microrganismos presentes nas alfaces, como por exemplo, óleo de orégano (GUNDUZ, GONUL, KARAPINAR, 2010), ácido peracético, diferentes métodos de lavagem (BARRERA, BLENKINSOP, WARRINER, 2012), hipoclorito de sódio 50 ppm e 200 ppm, vinagre 2% e 20% e lavagem com água (OLIVEIRA et al, 2012).

Segundo Selam et al (2009), a falta de validação de um procedimento e metodologia padronizada tornam difícil selecionar as estratégias saneantes mais adequadas para o desinfecção de produtos minimamente processados.

No que se refere à escolha do desinfetante ideal, esta deverá basear-se naquele que conseguir garantir a destruição total dos microrganismos patogênicos e a diminuição dos não patogênicos a uma quantidade que não possa influenciar de maneira prejudicial a qualidade e as características dos produtos, assim como a segurança do consumidor (Parish et al, 2003).

6. CONCLUSÕES

Após avaliar a resistência térmica de duas cepas de *E. coli* O157:H7, uma isolada de carcaça bovina (*E. coli* O157:H7 A13P3) e outra de água de lavagem de alfaces orgânicos (*E. coli* O157:H7), isoladas no sul do Brasil, nas temperaturas de 58, 60, 62, 65, 70, 72, 75 e 80°C observou-se que não houve crescimento de nenhuma das cepas após a exposição a temperatura de 80°C. Para as temperaturas de 58, 60, 65 e 70°C houve redução nas contagens, inativação somente após 3 minutos a 60°C ou 2 min a 65° para a CC, 2 min a 65°C para a ATCC8739 e A13P3. A 70, 72C e 75°C foram necessários 1 minutos para a redução significativa de todas as cepas. Após adaptação ácida a 60°C nenhuma cepa foi inativada, a 70°C foi observado aumento significativo da resistência térmica em relação as não adaptadas apenas para a cepa CC.

Os resultados da resistência ácida das duas cepas de *E. coli* O157:H7 referidas acima, demonstram que todas foram ácido resistentes, visto que, após a exposição ao caldo TSBm acidificado até o pH 2,0 obtidos com HCl, mesmo depois de três minutos as contagens das três cepas não foram totalmente reduzidas ficando em torno de 2 logUFC/ml. A maior redução foi obtida quando as cepas foram expostas ao AP pH 2.0, único tratamento que foi capaz de reduzir completamente as contagens de todas as cepas.

Após avaliar a capacidade de sobrevivência da *E. coli* O157:H7 A13P3 frente ao diclorocianurato de sódio, ácido orgânico, álcool etílico e quaternário de amônio os resultados demonstraram que a cepa de *E. coli* O157:H7 A13P3 foi mais resistente do que a cepa controle *E. coli* ATCC8739 quando confrontadas com o dicloroisocianurato e desinfetante a base de ácido orgânico. Não foram observadas diferenças significativas, no entanto, quando as cepas foram expostas ao álcool etílico e cloreto de benzalcônio em todos os tempos e concentrações avaliados.

Esses dados destacam a importância dos resultados obtidos no presente estudo, visto que, as cepas de *E. coli* O157:H7 analisadas demonstraram resistência a diferentes pH e maior resistência térmica devido a indução a resistência ácida. Estes dados, associados ao fato de que a cepa *E. coli* O157:H7 A13P3 foi isolada de carcaça de bovinos durante o processamento em frigorífico sob Inspeção Federal, no estado com um dos maiores consumos de carne do país. Destaca-se ainda e que a cepa *E. coli* O157:H7 A13P3 é resistente a dois dos desinfetantes mais utilizados pela indústria de alimentos.

Na avaliação da eficácia da redução de diferentes protocolos de limpeza e desinfecção de alface artificialmente contaminada com *E. coli* O157:H7 CC, constatou-se que a etapa de limpeza é a etapa mais importante no procedimento de higienização de vegetais folhos como a alface. Foram testados 11 tratamentos, dos quais 09 faziam uso de desinfetantes, destes todos tiveram desempenho semelhante, reduzindo as contagens tendo havido diferença significativa em relação aos demais tratamentos apenas para o

tratamento com solução clorada (200ppm/15min) T7 conduzido a 10°C para o qual se observou a maior redução. Destaca-se, no entanto que a etapa de desinfecção foi responsável por pelo menos mais 1 log de redução, o que em se tratando da O157:H7 pode significar ter ou não reduzido a dose infectante.

Desta forma, é fundamental o uso de protocolos de higienização que sejam eficazes na remoção dos patógenos e cada método possui as suas vantagens e desvantagens, dependendo de uma série de fatores como o desinfetante utilizado, a concentração do produto, tempo de contato, custo, entre outros. Nesse sentido os tratamentos utilizando ácido acético e ácido peracético apresentaram tornam-se uma boa opção na produção orgânica, visto que os mesmos apresentaram a mesma redução observada para os tratamentos que utilizaram cloro. O único tratamento que se destacou do demais durante a avaliação da resistência aos desinfetantes que o tratamento T7, conduzido a 10°C, que demonstrou ser bem mais eficaz frente aos demais. O uso de soluções desinfetantes com temperatura controlada, já vem sendo utilizado na Europa, com vista a segurança do manipulador.

Esses resultados demonstram que as cepas de O157:H7 são resistentes a diferentes situações de estresse, como temperatura, pH e desinfetantes, sendo portanto importantes do ponto de vista epidemiológico visto que estão presentes no ambiente e podem ser agentes causadores de surtos no RS.

7. REFERÊNCIAS

- ABDUL-RAOULF, U.M.; BCUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1999-2006, 1993.
- ACKERS, M.L et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.177, p.1588 - 1593, 1998.
- AKBAS M.Y ; OLMEZ H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. **Letters in Applied Microbiology**. 2007; 44:619-24.
- ALEXANDER, E.R. et al. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 9, p. 157-160, 1995.
- ATEBA, C.N.; MBEWE, M. Detection of *E. coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. **Research in Microbiology**, V. 162, p.240 – 248, 2011.
- AZAGRA, A.M.; IGLESIAS, M. I. Síndrome hemolítico urémico. **An Pediatr Contin.**, v.7, p. 79-88 79, 2009.
- BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; JERSE, A. EVirulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 979-980, 1992.
- BASTOS, P.A.M.B. **Sobrevivência de *Escherichia Coli* O157:H7 em logurtes**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.
- BELL, B.P. et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. **The Washington Experience, JAMA**, v.272, pp. 1349–1353. 1994.
- BENJAMIN, M.M.; DATTA, A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1669-1672, 1995.

BERGAMINI, A.M.M. et al. *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em amostras de carne coletadas nas regiões de Ribeirão Preto e Campinas, SP. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 30, 2004.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

BESSER, R.E. et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA**. V. 269, n.17, p.2217–2220, 1993

BERRY, E.D.; CUTTER, C.N. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p.1493-8, 2000.

BEUTIN, L. et al. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 183, p. 13-21, 1994.

BEUTIN, L. et al. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 631-635, 1995.

BEUTIN L. et al. Characterization of Shiga toxin-producing strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 42, p. 1099-1108, 2004

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2812-2814, 1996.

BEUTIN, L. et al. Characteristics and association with disease of two major subclones of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) O157 that are present among isolates from patients in Germany. **Microbiology and Infection Diseases**, v.44, p.337–346, 2002.

BEUTIN, L. Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Causes and Effects of the Rise of a Human Pathogen. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 53, n. 7, p. 299–305, 2006.

BLANCO, J.E. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.311-319, 2004.

BONETTI, V. et al. Hemolytic-Uremic Syndrome in Uberlândia, MG, Brazil. **International Scholarly Research Network - ISRN Pediatrics**. Volume 2011, Article ID 651749, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263568/>>. Acesso em: junho de 2012.

BRACEY, D.; HOLYOAK, C.D.; COOTE, P.J. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH? **Journal of Applied Microbiology**, 85, p.1056-66, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria 101/93, do MAPA**. Disponível em: <<http://www.crmvgo.org.br/legislacao/OVOS/POR00000101.pdf>>. Acesso: em março 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004** – MS. disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em :março 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Portaria Nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Disponível em: http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf. Acesso em: maio de 2012.

BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. Enterobacteriaceae. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. v.2. New York: Springer Science+Business Media Inc. p.587-607. 2005.

BUSTAMANTE, A.V. et al. Genetic diversity of O157:H7 and non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* from Argentina inferred from multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p.212–217, 2010.

CALDERWOOD, S.B. et al. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**. v.62, p. 118-9, 1996.

CANTARELLI, V. et al. Isolation of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 266-270, 2000.

CAPRIOLI, A. et al. *Enterohaemorrhagic Escherichia Coli*: Emerging, issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, p. 289-311, 2005.

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

CERQUEIRA, A.M.F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, p. 111-121, 1999.

CLARK, M. **About *E. coli***. Disponível em: <<http://www.aboutecoli.com/page5.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2012.

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

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

CDC- CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.278, p.809-810, 1997.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. Ongoing Multistate Outbreak of *E. coli* serotype O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach - United States, September 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.26, p.1-2, 2006.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, USA. **FoodNet 2006 surveillance report**. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. **Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>. Acesso em: 02 junho, 2012.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – **CVE-SP**. Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar – Síndrome hemolítico-Urêmica

e *E.coli* O157: H7. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/IFNET9807_SHU.xls Acesso em: 02 de junho de 2012.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE-SP. **Casos confirmados e coeficientes de incidência de casos autóctones de doenças de notificação compulsória no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2011.** Disponível em: <http://www.cve.sp.gov.br/> Acesso em: 06 de junho de 2012.

CVS- SP. Portaria nº 05, de 09 de abril de 2013. Acesso em março, 2014.
CHEVILLE, A.M. et al. *rpoS* regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1822-1824, 1996.

COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.20, p. 1-9, 1998.

COGHLAN, A. Deadly *E. coli* strains may have come from South America. **New Scientist**, p. 12, 1998.

COMO-SABETTI, K.; REAGAN, S.; ALLAIRE, S. et al. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts - Michigan and Virginia, June-July 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 46, p. 741-744, 1997.

COPPO, P. et al. pour le Réseau d'étude des microangiopathies thrombotiques de l'adulte Purpura thrombotique thrombocytopenique. **EMC-Hématologie**, v.2, p.14–34, 2005.

CRISTANCHO L. et al. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in white veal calves. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.200–209, 2008.

DELAQUIS, P. et al. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat Iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. *Journal of Food Protection* 65, 459–464, 2002.

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

DOYLE, M.P.; PADHYE, V.V. *E. coli*. In: DOYLE, M.P. (Ed). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, p.236-282, 1989.

EDUARDO, M.B.; MELLO, M.L.R.; KATSUYA, E.M. 2002. **Síndrome Hemolítico Urêmica-Normas e Instruções**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2006.

EKLUND, T. The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the protonmotive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. **Journal of general microbiology**, 131, p. 73-76, 1985.

ETCHEVERRÍA, A.I., PADOLA, N.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**. V.5, p.366-72. 2013.

FAITH, N. G.; SHERE, J. A.; BROSCHE, R. et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1519-1525, 1996.

FARROKL et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p.190–212, 2013.

FERNANDEZ-BRANDO, R. J. Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico. Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **MEDICINA**, Buenos Aires, v.71, p. 383-389, 2011.

FENG, P., *Escherichia coli* Serotype O157: H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. U.S. **Food and Drug Administration**, Washington, v. 1, n. 2, 1995.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. **Diarrheogenic *Escherichia coli***. In: **Chapter 4A, Bacteriological Analytical Manual on line**. Food and Drug Administration – FDA/CFSAN 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>> Acesso em: 15 junho 2012.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos* United Kingdom, Wiley-Blackwell, 2^o ed., p.496, 2013.

FRATAMICO, G.P.M.; DEBROY, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food Using Real-Time Multiplex PCR Assays Targeting the stx1, stx2, wzyO157, and the fliCh7 or eae. **Food Analytical Methods**, 2010. Disponível em: <http://ecoli.cas.psu.edu/publications/documents/FoodAnalmeth2010.pdf>. Acesso em: junho de 2012.

GANNON, V.P. et al. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, n.3, p. 656 – 662, 1997.

GEARY, D.F., Hemolytic Uremic Syndrome and *Streptococcus Pneumoniae*: Improving our Understanding. 114 Editorials **The Journal of Pediatrics**, p. 140, 2007.

GLASS, K.A. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2513-2516, 1992.

GORDILLO, R. et al. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products. **Meat Science**, v. 88, p.767–773, 2011.

GARBER, L. P.; WELLS, S. J.; HANCOCK, D. D. et al. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.207, p. 46-49, 1995.

GRIFFIN, P.M.; MEAD P.S.; SIVAPALASINGAM, S. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli*. In: **Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrante R.L., editors. Infections of the gastrointestinal tract**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 627-642, 2002.

GUTH, B.E. et al. First shiga toxin-producing *E. coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, p.535-536, 2002.

GORDEN, J., A.N.D.P. L. C. SMALL. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**. V.61, p.364–367, 1993.

GUTH et al. *Escherichia coli* Situation in Brazil. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**, chapter 11, p.162-178, 2010

GÜNDÜZ, G.; GÖNÜL, S.; KARAPINAR, M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. **Food Control**, v. 21, p. 513–517, 2010.

IRINO, K. et al. O157:H7 shiga toxin-producing *E. coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.8, n.4, p.446-447, 2002.

JACOB, M.E. et al. Evaluation of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Quantification of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, n.1, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.

KARAPINAR, M.; GONUL, S. A.. Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, pág 343–347, 1992.

KARMALI, M.A. et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.189, n.3, p. 556-63 2004.

KAPER, J.B. et al. Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. **In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 163–182. 1998.

KATSUYA, E.M. et al. *Escherichia coli* O157:H7, um enteropatógeno emergente. **Revista CIP**, Ano 1, n. 1, p. 7- 8, 1998.

KEENE W.E. et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *E. coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.331, p.579-584, 1994.

LANG, M.M.; HARRIS, L. J.; BEUCHAT, L. R. Survival and recovery of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. **Journal of Food Protection**, v. 67 n. 6, p.1092–1103. 2004.

LAEGREID, W.W.; ELDER, R.O.; KEEN, J.E. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. **Epidemiology and Infection**, v.123, p.291-298, 1999.

LANIER, W.A., et al. Outbreak of Shiga-Toxigenic *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Rodeo Attendance, Utah and Idaho, 2009. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 8, n.10, 2011.

LIN, J. et al. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.3094-3100, 1996.

LEUNG, P.H.M. et al. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiology and Infections**, v. 126, n. 2, p.173-179, 2001.

LYNCH, M. F., TAUXE, R. V., & HEDBERG. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p.307e 315, 2009.

LOIKO, M. R. Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS. 2013.

MARLER, B. In: **Poisoned: The True Story of the Deadly E. Coli Outbreak That Changed the Way Americans Eat**. BENEDICT, J. Inspire Books , 2011.

MALHEIROS, P.S. et al. Acid And Thermal Resistance Of A Strain Involved In Several Foodborne Outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 302-317, 2009.

MCKELLAR, C.R.; DELAQUIS, P. Development of a dynamic growth–death model for *E. coli* O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p. 7–14, 2011.

MENG, J.; DOYLE, M.P. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D. (Eds). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.98.

MICHINO, H.; ARAKI, H.; MINAMI, S. Recent outbreak of infections caused by *E. coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J.B; O'BRIEN, A.D. (Eds). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington DC: ASM Press, p.73-81, 1998.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V.M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n.3, p.175-82, 2006.

MORGAN D.; NEWMAN C.P.; PALMER, S.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.101, p.83-91, 1988.

MORELLI, A.M.F. **Escherichia coli O157:H7: Ocorrência em Ambiente de Produção de Leite na Microrregião de Viçosa, Adesão em Diferentes Superfícies e Resistência a Sanitizantes**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MORENO, A.C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 2008.

NASCIMENTO, M.S. et al. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal of Food Technology**.v. 61, p.63-68, 2003.

NATARO J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 142–201, 1998.

NISHIMURA, L.S.; SOUZA, R.L.; GUTH, B.E.C. Identificação de um caso de síndrome hemolítica urêmica relacionado à infecção por *E. coli* produtora da toxina Shiga O157 no estado de São Paulo, Brasil. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXIII, 2005**, Santos, SP. *Anais...* Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. CDROM.

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

OLANIRAN, A.O.; NAICKER, K.; PILLAY, P. Toxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*: Classification, pathogenesis and virulence determinants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n.4, p. 94-100, 2011.

OLIVEIRA , M. et al. Presence and survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p.133–140, 2012.

OLMEZ, H, KRETZSCHMAR U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**. V. 42, p.686-93, 2009.

OLSEN, S.J.; MacKINON, L.C.; GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, n SS01, p. 1-51, 2000.

PARISH, M.E. et al. Chapter V - Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**.v. 2, p.161-73, 2003.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *E. coli* O157:H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.7, p.555-565, 1992

PATON, A.W. et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated

with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.1622-1627, 1996.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews** v.11, p. 450 – 479, 1998.

PENNINGTON. H. *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 376, p.1428–35, 2010.

PIGATTO, C.P.; ITURRINO, R.P.S.; PICHETCH, C.M.T.F.; CHIODA, T.P.; VITTORI, J.; MARIN, J.M. Viabilidade de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) não-O157 em queijo Tipo Minas Frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 663-668, 2009.

RILEY, L.W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, p.681–685, 1983.

REITSMA, C.J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, p.460-464, 1996.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; BALBI, L. et al. Intestinal bleeding and occlusion associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127: H21. **Medicina**, Buenos Aires, v. 60, p. 249-252, 2000.

RIVAS M. et al. Síndrome urémico hemolítico: asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Medicina** (B Aires), v.66 (suppl. III), p. 27–32, 2006.

RIVAS, M. et al. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin–producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, 763, 2008.

RODRIGUES, R.Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, 42, p. 152-164, 2014.

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

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

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: A molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 448 p.

SANDRINI, C.N.M. et al. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n.1, p. 175- 182, 2007.

SANTOS, Y.T.O. **Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação da Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2007.

SAUCEDO, S.L. et al. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *E. coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, 2003.

SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Unspecified Agents. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, No. 1, 2011.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v.63, p.1055-1061, 1995.

SCHMIDT, H. et al. New Shiga Toxin 2 Variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**. 66: 1205-8, 2000.

SES-RS- PORTARIA Nº 78/2009. Disponível em:<
http://www.saude.rs.gov.br/lista/402/Vigil%C3%A2ncia_Sanit%C3%A1ria_%3E_Alimentos_%3E_Legisla%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: março 2014.

SES-RS- PORTARIA Nº 325/2010. Disponível em:<
http://www.saude.rs.gov.br/lista/402/Vigil%C3%A2ncia_Sanit%C3%A1ria_%3E_Alimentos_%3E_Legisla%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: março 2014.

SEPUTIENE, V., DAUGELAVICIUS, A., SUZIEDELIS, K. AND SUZIEDELIENE, E. Acid response of exponentially growing *Escherichia coli* K-12. **Microbiology Research**, v.161, p. 65-74, 2005.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p. 167-173, 2003.

SILVA, N. ***Escherichia coli* 0157:H7 em alimento**. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

SENAI-SP. Escola SENAI “Horácio Augusto da Silveira”. **Elementos de Apóio para Elaboração de Planos APPCC**. 2. ed. São Paulo, 2007.155p

SHAH, D. H. et al. *Escherichia*. In Liu, D. (Ed). **Molecular detection of foodborne pathogens**, p. 369-389. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. 2009.

SHERE, J.A.; BARTLETT, K.J.; KASPER, C.W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farm in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1390-1399, 1998.

SOUZA, R.L. et al. Hemolytic Uremic Syndrome in Pediatric Intensive Care Units in São Paulo, Brazil. **The Open Microbiology Journal**, 5, (Suppl 1-M5) 76-82, 2011.

STELLA, A.E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de Água, leite e fezes de bovinos leiteiros da Região de ribeirão Preto-SP, Brasil**. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal– São Paulo, 2009.

TORRES, A. G.; PAYNE, S. M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 825 833, 1997.

WATANABE, Y.; OZASA, K. An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Rinsho Byori**, Osaka, v.45, p.869-874, 1997.

WEAGANT, S.D. BRYANT, J.L.; JINNEMN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *E. coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.01, p.7-12, 1995.

WHO. Prevention and control of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections. **WHO/FSF/FOS/97.6**, World Health Organization, 1997.

USDA (United States Department of Agriculture). ***E. coli* O157:H7: issues and ramifications**. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 1994, 48p.

VAZ, T.M.I. et al. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *E. coli* in São Paulo, Brazil, from 1976. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 903-905, 2004.

XIONG, Y. et al. A Novel *Escherichia coli* O157:H7 Clone Causing a Major Hemolytic Uremic Syndrome Outbreak in China. **PLoS ONE**, v.7, n.4, e 36144.

ZHAO T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p.780-3, 1994.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider without preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.2526-2530, 1993.

ZHANG, W. et al. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from human. **Journal Clinical Microbiology**. 40: 1441-6, 2002.

8. ANEXOS

Anexo 1. Tabelas de resultados da análise estatística.

Tabela 1. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 50°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 50°C, t=0			T = 50°C, t=1		
Bacteria	N	Subconjunto	Bacteria	N	Subconjunto
		1			1
ATCC8739	9	1,12	A13P3	9	1,28
A13P3	9	1,15	ATCC8739	9	1,39
CC	9	1,39	CC	9	1,43
Sig.		0,46	Sig.		0,86
T = 50°C, t=2			T = 50°C, t=3		
Bacteria	N	Subconjunto	Bacteria	N	Subconjunto
		1			1
ATCC8739	9	1,02	ATCC8739	9	1,10
A13P3	9	1,34	A13P3	9	1,26
CC	9	1,41	CC	9	1,34
Sig.		0,33	Sig.		0,64

Tabela 2. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 58°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 58°C, t=0				T = 58°C, t=1			
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto	
		1	2			1	
ATCC8739	9	1,29		ATCC8739	9	1,48	
CC	9	1,45	1,45	CC	9	1,89	
A13P3	9		1,78	A13P3	9	1,90	
Sig.		0,70	0,23	Sig.		0,12	
T = 58°C, t=2				T = 58°C, t=3			
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto	
		1	2			1	2
ATCC8739	9	1,54		ATCC8739	9	1,76	
CC	9	1,65		CC	9	2,04	
A13P3	9		2,92	A13P3	9		3,04
Sig.		0,91	1,00	Sig.		0,72	1,00

Tabela 3. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 60°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 60°C, t=0				T = 60°C, t=1					
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto			
		1	2			1	2		
A13P3AD	9	1,19		ATCC8739 AD	9	1,42			
ATCC8739	9	1,37		CC AD	9	1,49			
CC AD	9	1,42		ATCC8739	9	1,90	1,90		
ATCC8739AD	9	1,45		A13P3 AD	9	1,98	1,98		
CC	9	1,75		CC	9		2,65		
A13P3	9	1,95		A13P3	9		2,92		
Sig.		0,07		Sig.		0,62	0,06		
T = 60°C, t=2				T = 60°C, t=3					
Bacteria	N	Subconjunto			Bacteria	N	Subconjunto		
		1	2	3			1	2	3
CC AD	9	1,41			CC AD	9	1,64		
ATCC8739 AD	9	1,44			ATCC8739 AD	9	1,65		
ATCC8739	9	1,70			ATCC8739	9	2,56		
CC	9		2,50		A13P3 AD	9	3,04		
A13P3 AD	9		2,57		A13P3	9		4,97	
A13P3	9			3,78	CC	9			8,47
Sig.		,70	1,00	1,00	Sig.		,15	1,00	1,00

Tabela 4. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 65°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 65°C, t=0			T = 65°C, t=1		
Bacteria	N	Subconjunto	Bacteria	N	Subconjunto
		1			1
CC	9	1,90	CC	9	7,10
A13P3	9	2,26	ATCC8739	9	7,18
ATCC8739	9	2,39	A13P3	9	7,43
Sig.		0,23	Sig.		0,88

T = 65°C, t=2				T = 65°C, t=3		
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto
		1	2			1
A13P3	9	6,20		CC	9	7,57
CC	9	7,52	7,52	A13P3	9	8,33
ATCC8739	9		7,93	ATCC8739	12	8,37
Sig.		0,14	0,81	Sig.		0,12

Tabela 5. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 70°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 70°C, t=0				T = 70°C, t=1		
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto
		1	2			1
ATCC8739 AD	9	2,51		A13P3	9	6,12
A13P3 AD	9	2,52		CC AD	9	6,41
A13P3	9	2,71		CC	9	7,04
CC	9	2,83	2,83	ATCC8739	9	7,44
CC AD	9	2,90	2,90	ATCC8739 AD	9	7,64
ATCC8739	9		3,31	A13P3 AD	9	8,13
Sig.		0,29	0,11	Sig.		0,05

T = 70°C, t=2			T = 70°C, t=3				
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto	
		1	2			1	2
A13P3	9	7,40		CC	9	7,57	
ATCC8739	9	7,44		A13P3 AD	9	8,13	8,13
CC	9	7,54		A13P3	9	8,33	8,33
CC AD	9	7,98		ATCC8739	9	8,34	8,34
A13P3 AD	9	8,13		CC AD	9		8,49
ATCC8739 AD	9	8,51		STE AD	9		8,51
Sig.		0,29		Sig.		0,14	0,80

Tabela 6. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 72°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 72°C, t=0			T = 72°C, t=1				
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto	
		1				1	2
ATCC8739	9	3,64		A13P3	9	6,37	
A13P3	9	3,70		CC	9	7,81	
CC	9	3,85		ATCC8739	9	8,34	
Sig.		0,70		Sig.		1,00	
		T = 72°C, t=2				T = 72°C, t=3	
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto	
		1				1	
A13P3	9	8,33		A13P3	9	8,33	
ATCC8739	9	8,34		ATCC8739	9	8,34	
CC	9	8,47		CC	9	8,47	
Sig.		0,13		Sig.		0,13	

Tabela 7. Resultados estatísticos das comparações das reduções médias das contagens das cepas de *E. coli* O157:H7 A13P3 e CC e *E. coli* ATCC 8739 a 75°C em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

T = 75°C, t=0				T = 75°C, t=1		
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto
		1	2			1
ATCC8739	9	3,93		A13P3	9	6,48
CC	9			CC	9	6,69
A13P3	9			ATCC8739	9	6,70
Sig.		1,00		Sig.		0,95
		T = 75°C, t=2				T = 75°C, t=3
Bacteria	N	Subconjunto		Bacteria	N	Subconjunto
		1				1
A13P3	9	8,33		A13P3	9	8,33
ATCC8739	9	8,34		ATCC8739	9	8,34
CC	9	8,47		CC	9	8,47
Sig.		0,13		Sig.		0,13

Tabela 8. Resultados estatístico da comparação das reduções médias das contagens da cepa A13P3 após exposição a solução de TSBm acidificada com ácido clorídrico e ácido propionico em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Redução A13P3 t=0				Redução A13P3 t=1					
Tratamento	N	Subconjunto		Tratamento	N	Subconjunto			
		1	2			1	2	3	
AP 4.5	9	0,74		AP 4.5	9	0,89			
HCL 6.5	9	1,32		HCL 6.5	12	1,05			
AP 3.5	9	1,37		HCL 4.5	9	1,33			
HCL 4.5	9	1,38		HCL 3.5	9	1,42			
AP 9.5	9	1,39		AP 6.5	9	1,45			
AP 6.5	9	1,44		AP 9.5	9	1,46			
HCL 2.0	9	1,45		AP 3.5	9	1,47			
HCL 3.5	9	1,47		HCL 9.5	9	1,5			
HCL 9.5	9	1,48		HCL 2.0	9		2,45		
AP 2.0	9		7,88	AP 2.0	9			7,88	
Sig.		0,22	1	Sig.		0,39	1	1	
Redução A13P3 t=2				Redução A13P3 t=3					
Tratamento	N	Subconjunto			Tratamento	N	Subconjunto		
		1	2	3			1	2	3
AP 4.5	9	,89			AP 4.5	9	,80		
HCL 6.5	12	1,05			HCL 3.5	9	,95		
HCL 4.5	9	1,33			AP 6.5	9	1,37		
HCL 3.5	9	1,42			AP 9.5	9	1,42		
AP 6.5	9	1,45			HCL 6.5	9	1,44		
AP 9.5	9	1,46			HCL 9.5	9	1,44		
AP 3.5	9	1,47			HCL 4.5	9	1,52		
HCL 9.5	9	1,50			AP 3.5	9	1,59		
HCL 2.0	9		2,45		HCL 2.0	9		2,75	
AP 2.0	9			7,88	AP 2.0	9			7,88
Sig.		,39	1,00	1,00	Sig.		,14	1,00	1,00

Tabela 9. Resultados estatístico da comparação das reduções médias das contagens da cepa ATCC8739 após exposição a solução de TSBm acidificada com ácido clorídrico e ácido propionico em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Redução STE t=0					Redução STE t=1					
Tratamento	N	Subconjunto			Tratamento	N	Subconjunto			
		1	2	3			1	2	3	
HCL 6.5	9	1,18			AP 9.5	9	,99			
HCL 2.0	6	1,34	1,34		HCL 6.5	9	1,08			
AP 3.5	9	1,41	1,41		HCL 2.0	6	1,38	1,38		
HCL 9.5	9	1,51	1,51		AP 3.5	9	1,50	1,50		
AP 4.5	9	1,63	1,63		HCL 9.5	9	1,57	1,57		
HCL 4.5	9	1,65	1,65		AP 4.5	9	1,59	1,59		
AP 9.5	9	1,67	1,67		HCL 4.5	9	1,66	1,66		
AP 6.5	9		1,76		HCL 3.5	9		1,88		
HCL 3.5	9		1,86		AP 6.5	9		1,90		
AP 2.0	9			8,25	AP 2.0	9			8,25	
Sig.		0,12	0,09	1,00	Sig.		,07	,34	1,00	
Redução STE t=2					Redução STE t=3					
Tratamento	N	Subconjunto			Tratamento	N	Subconjunto			
		1	2	3			1	2	3	4
AP 3.5	9	1,00			HCL 6.5	9	1,03			
HCL 6.5	9	1,06	1,06		HCL 4.5	9		1,57		
HCL 9.5	9	1,33	1,33		AP 6.5	9		1,58		
HCL 2.0	6	1,53	1,53		HCL 9.5	9		1,59		
HCL 4.5	9	1,56	1,56		AP 4.5	9		1,63	1,63	
AP 6.5	9	1,62	1,62		AP 3.5	9		1,64	1,64	
HCL 3.5	9	1,67	1,67		HCL 3.5	9		1,66	1,66	
AP 4.5	9		1,67		AP 9.5	9		1,68	1,68	
AP 9.5	9		1,70		HCL 2.0	6			2,10	
AP 2.0	9			8,25	AP 2.0	9				8,25
Sig.		0,05	0,06	1,00	Sig.		1,00	1,00	0,10	1,00

Tabela 10. Resultados estatístico da comparação das reduções médias das contagens da cepa CC após exposição a solução de TSBm acidificada com ácido clorídrico e ácido propionico em função do tempo de exposição, avaliadas pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Redução CC t=0				Redução CC t=1					
Tratamento	N	Subconjunto		Tratamento	N	Subconjunto			
		1	2			1	2		
HCL 4.5	9	1,58		HCL 4.5	9	1,61			
HCL 3.5	9	1,64		HCL 6.5	9	1,62			
AP 6.5	9	1,64		AP 9.5	9	1,65			
HCL 6.5	9	1,65		HCL 9.5	9	1,66			
AP 3.5	9	1,66		AP 3.5	9	1,71			
HCL 9.5	9	1,67		HCL 3.5	9	1,73			
AP 9.5	9	1,70		AP 6.5	9	1,75			
AP 4.5	9	1,77		AP 4.5	9	1,77			
HCL 2.0	9	1,77		HCL 2.0	9	1,93			
AP 2.0	9		8,05	AP 2.0	9		8,05		
Sig.		0,80	1,00	Sig.		0,06	1,00		
Redução CC t=2				Redução CC t=3					
Tratamento	N	Subconjunto			Tratamento	N	Subconjunto		
		1	2	3			1	2	3
HCL 4.5	9	1,59			AP 4.5	9	1,53		
AP 6.5	9	1,60			AP 6.5	9	1,61		
HCL 6.5	9	1,61			HCL 3.5	9	1,63		
AP 4.5	9	1,62			AP 9.5	9	1,66		
AP 3.5	9	1,63			HCL 9.5	9	1,66		
HCL 3.5	9	1,64			HCL 4.5	9	1,67		
HCL 9.5	9	1,66	1,66		HCL 6.5	9	1,70		
AP 9.5	9	1,88	1,88		AP 3.5	9	1,75		
HCL 2.0	9		2,01		HCL 2.0	9		2,16	
AP 2.0	9			8,05	AP 2.0	9			8,05
Sig.		0,27	0,06	1,00	Sig.		0,49	1,00	1,00

Anexo 2

- Artigo de revisão submetido a Revista Ciencia Rural: ***Escherichia coli***
O157:H7: características gerais e ocorrência no Brasil.

1 *Escherichia coli* O157:H7: características gerais e ocorrência no Brasil

2 *Escherichia coli* O157:H7: general characteristics and occurrence in Brazil

3 Cheila Minéia Daniel de Paula^{I*}, Márcia Regina Loiko^{II}, Eduardo Cesar Tondo^I

4
5 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

6 **RESUMO**

7 *Escherichia coli* O157:H7 é um dos patógenos alimentares mais importantes da
8 atualidade, uma vez que tem sido responsável por severos surtos alimentares em muitos
9 países. Vários trabalhos avaliando inúmeras de amostras de alimentos indicaram uma baixa
10 frequência de isolamento de *E. coli* O157:H7 em produtos brasileiros. Esses dados, porém,
11 devem ser interpretados com cuidado, uma vez que, no Brasil, não há um monitoramento
12 sistemático que possa indicar a verdadeira situação da ocorrência dessa bactéria em alimentos
13 e vários casos clínicos de SHU já foram registrados, inclusive um associado a *E. coli*
14 O157:H7. Além disso, muitas pesquisas têm indicado o isolamento cada vez mais frequente
15 do microrganismo em reservatórios animais, principalmente bovinos, evidenciando a
16 necessidade de monitoramento das linhagens produtoras de toxina shiga (STEC), pois em um
17 mundo globalizado, microrganismos emergentes podem ser rapidamente disseminados. O
18 objetivo deste estudo é apresentar a situação atual da *E. coli* O157:H7 no Brasil.

19 **Palavras-chave:** *Escherichia coli* O157:H7, Síndrome Hemolítica Hemolítica (SHU), Doenças
20 Transmitidas por Alimentos.

21 ^(I) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do
22 Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, n.500, CEP:
23 90050-1709, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: cheilapaula@yahoo.com.br.

24 *Autor para correspondência.

25 ^(II) Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fundação Estadual de Pesquisa
26 Agropecuária – FEPAGRO. Estrada do Conde, n.6000, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul,
27 Brasil. E-mail: marcialoiko@hotmail.com.

28

29 **ABSTRACT**

30 *Escherichia coli* O157: H7 is the major foodborne pathogens in the present,
31 since it has been responsible for severe outbreaks food in many countries. Several
32 studies evaluate numerous food samples indicating a low frequency of isolation of *E.*
33 *coli* O157:H7 in Brazilian products. However, these data should be interpreted carefully
34 since in Brazil there is no systematic monitoring that might indicate the true situation of
35 the occurrence of these bacteria in food and several clinical cases of HUS have been
36 recorded, including one associated with *E. coli* O157:H7. Moreover, numerous
37 researches has been indicating the increasingly frequent isolation of microorganisms in
38 animal reservoirs, mainly in cattle, suggesting the necessity of monitoring of shiga
39 toxin-producing strains (STEC), because in a globalized world, emerging
40 microorganisms could be rapidly disseminated. The objective of this study is present the
41 current situation of *E. coli* O157: H7 in Brazil.

42

43 **Key words:** *Escherichia coli* O157:H7, Hemolytic Uremic Syndrome (HUS),
44 foodborne illness.

45 ***Escherichia coli* O157:H7**

46 A maioria das cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) não causa doenças e faz parte
47 da flora normal do trato intestinal dos animais, inclusive dos humanos
48 (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006; FENG et al., 2011, TCHAPTCHET &
49 HANSEN, 2011). Alguns tipos de *E. coli*, no entanto, podem ser patogênicos causando
50 diarreia, infecções urinárias, doenças respiratórias, pneumonia e outras doenças
51 (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006; BERTÃO & SARIDAKIS, 2007), enquanto

52 outras podem causar graves Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), como é o caso
53 das *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC).

54 Existem mais de 400 sorovares de STEC (BLANCO et al., 2004), porém, o
55 grupo clinicamente associado com colite hemorrágica (HC) é designado de EHEC
56 (*Enterohaemorrhagic E. coli*) (BERTÃO& SARIDAKIS, 2007; FENG et al., 2011;
57 FORSYTHE, 2013). EHEC estão frequentemente implicadas em doenças humanas
58 severas (NATARO; KAPER, 1998), dentre estas, o sorovar associado com maior
59 frequência com os surtos mais severos é O157:H7, indicando que essas cepas são mais
60 patogênicas ou mais transmissíveis do que as outras (FORSYTHE, 2013).

61 Apesar de *E. coli* O157: H7 provocar muitas das manifestações relacionadas
62 com STEC, nos EUA, STEC não-O157 também são relacionadas com inúmeros casos
63 (SCALLAN et al, 2011). Nos Estados Unidos, os sorogrupos O26, O45, O103, O111,
64 O121 e O145 causam a maioria dos casos de doença devido a não-O157. Estes
65 sorogrupos de STEC são referidos como "top six" ou "Big Six". (BETTELHEIM, 2007;
66 MELLMANN et al., 2009; EFSA, 2009; MATHUSA et al, 2010; SCHAFFZIN et al.,
67 2012). Outros sorogrupos de STEC, incluindo O113 e O91 também têm sido associados
68 a casos e surtos de HC e HUS em muitos países (PATON et al, 1998; JOHNSON et al,
69 2006; BETTELHEIM, 2007; EFSA, 2009; MELLMANN et al., 2009).

70 *E. coli* O157:H7 foi reconhecida como patógeno alimentar, pela primeira vez,
71 nos estados de Oregon e Michigan, nos Estados Unidos, em 1982, causando dois surtos
72 de diarreia sanguinolenta severa, envolvendo pelo menos 47 pessoas, após a ingestão de
73 sanduíches contendo hambúrgueres de carne bovina, molho de cebola e pickles,
74 distribuídos em uma rede de *fast food*. *Escherichia coli* O157:H7 foi isolada de 9 das 12
75 diarreias de vítimas dos dois surtos e também de uma amostra de hambúrguer coletado

76 em Michigan (RILEY et al., 1983). Segundo os mesmos autores, esse sorovar já tinha
77 sido isolado de um caso clínico esporádico de colite hemorrágica, em 1975. Apesar da
78 severidade dos sintomas, os surtos não foram amplamente divulgados, na época. Depois
79 de mais de uma década sem ser associada a surtos alimentares, em 1993, *E. coli*
80 0157:H7 foi responsável por um surto, envolvendo cerca de 700 pessoas, devido ao
81 consumo de hambúrgueres mal passados distribuídos por outro *fast food* nos Estados
82 Unidos. Dentre os envolvidos, mais de 40 casos evoluíram para SHU e 4 pessoas
83 morreram (CDC 1993). A partir desse episódio, o qual foi considerado o “11 de
84 setembro” da segurança dos alimentos nos EUA, *E. coli* 0157:H7 ganhou ampla
85 notoriedade e foi isolada de muitos alimentos envolvidos em muitos surtos, em
86 diferentes países (MARLER, B. 2011).

87 **Fatores de virulência de *E. coli* O157:H7**

88 Os mecanismos pelos quais *E. coli* O157:H7 causam HC e SHU ainda não foram
89 totalmente elucidados (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007). Um fator de virulência
90 essencial no entanto é a produção de pelo menos uma toxina Shiga (Stx) (codificadas
91 por genes *Stx1* e *stx2*), (PENNINGTON, 2010). Além desses, destacam-se também a
92 intimina (codificada pelo gene *eae*) e EHEC hemolysin (codificada pelo gene *Ehly*)
93 (SALLAM et al., 2013). Dados epidemiológicos sugerem que a Stx2 é mais importante
94 no desenvolvimento de SHU do que a Stx1 (AZAGRA & INGLESIAS, 2009). Tanto
95 Stx1 quanto Stx2 sejam importantes fatores de virulência de STEC, cepas produtoras de
96 Stx2 são mais virulentas e relacionadas com mais frequência a doenças graves como
97 HUS (PIANCIOLA et al., 2014). O gene *fliCH7* codifica o antígeno flagelar de *E. coli*
98 O157:H7 e também tem sido investigado como fator de virulência das STEC
99 (GANNON et al., 1997).

100 **Doenças causadas por *E. coli* 0157:H7**

101 De forma geral, *E. coli* O157:H7 podem transmitir três doenças conhecidas
102 como colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU), e Púrpura
103 Trombocitopênica Trombótica (PTT) (RIVAS et al., 2008). Em cerca de três dias após o
104 consumo dos alimentos contaminados, as vítimas desse microrganismo apresentam
105 diarreia sem sangue e dores abdominais severas. Nesse período, que dura
106 aproximadamente três dias, pode ocorrer vômitos e, em alguns casos, febre fraca. Em
107 seguida, as dores abdominais aumentam e surge a diarreia sanguinolenta (colite
108 hemorrágica), a qual pode resultar em evacuações de apenas sangue e ausência de fezes,
109 com duração de até uma semana. Após aproximadamente quatro dias do aparecimento
110 dos sintomas, cultivos positivos do microrganismo podem ser obtidos a partir das fezes.
111 Cerca de 85 % das colites hemorrágicas são auto-limitantes, ou seja, curam sozinhas.
112 Porém, em 15 % dos casos ela evolui para a SHU. A SHU é a complicação mais severa
113 da infecção entérica, sendo considerada a principal causa de insuficiência renal aguda
114 em crianças (NATARO & KAPER, 1998; FORSYTHE, 2013), e as pessoas
115 principalmente afetadas por ela são as crianças com menos de cinco anos e idosos
116 maiores de 65 (SÁNCHEZ et al., 2010). Essa síndrome pode ser diagnosticada em
117 média 7+/-2 dias após o aparecimento da diarreia (CVE/CCD/SES-SP, 2011). A SHU é
118 definida pela tríade, anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda.
119 Esta síndrome ocorre quando os rins são afetados pelas toxinas produzidas pela *E. coli*
120 0157:H7 (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006). Clinicamente, pacientes com
121 SHU apresentam-se seriamente doentes ou, algumas vezes, com icterícia e
122 frequentemente com hipertensão. Os pacientes podem apresentar problemas no sistema
123 cardiovascular e sistema nervoso central com infartos cardíacos, ataques repentinos de

124 apoplexia, coma e encefalopatias hipertensivas. A doença pode levar à morte
125 (CVE/CCD/SES-SP, 2011). A maioria dos pacientes (90%) recupera-se com terapias
126 apropriadas, mas de 3 a 5% das crianças vão a óbito e aproximadamente 12 a 30% têm
127 sequelas severas, que incluem falha renal grave, hipertensão e/ou manifestações no
128 sistema nervoso central (NATARO & KAPER, 1998; FORSYTHE, 2013). Como não
129 há uma terapia específica para a SHU à maioria dos pacientes requer tratamento
130 prolongado, envolvendo diálise, transfusão de sangue ou transplante de rins (USDA,
131 1994; EDUARDO et al., 2002, AZAGRA & IGLESIAS, 2009).

132 A infecção por *E. coli* O157:H7 também pode desencadear o quadro de PTT,
133 caracterizado por anemia hemolítica micro angiopática, trombocitopenia, manifestações
134 neurológicas, insuficiência renal e febre. Pacientes com PTT exibem características
135 clínicas e patológicas semelhantes à de pacientes com SHU, porém o envolvimento do
136 sistema nervoso central é a principal característica. Pode ocorrer à formação de
137 coágulos sanguíneos, o que resulta frequentemente em morte (CVE/CCD/SES-SP,
138 2011), é uma síndrome que geralmente acometem adultos.

139 **Reservatórios e dose infectante**

140 Os bovinos têm sido identificados como o principal reservatório de *E. coli*
141 O157:H7, uma vez que podem excretar o patógeno pelas fezes e assim contaminar
142 alimentos, água e ambientes (LAEGREID et al., 1999; SHERE et al., 1998; CDC,
143 2009). Embora a quantidade de microrganismos necessária para causar a doença não
144 seja conhecida (dose infectante), suspeita-se que seja similar à da *Shigella* sp. (10
145 microrganismos) (FENG et al., 2011; FORSYTHE, 2013). A ingestão de leite cru
146 (FARROKH et al., 2013), alface (ACKERS et al, 1998; CDC 2012), batatas
147 (MORGAN et al., 1988), brotos de rabanete (WATANABE & OZASA, 1997), brotos

148 de alfafa (CDC, 1997) também tem sido associada a surtos. Existem ainda casos onde a
149 transmissão ocorreu ao nadar ou beber água contaminada por esgoto (água não tratada)
150 (PENNIGTON, H., 2010) e também devido a transmissão pessoa a pessoa (AZASRA &
151 INGLESIAS, 2009).

152 **Casos clínicos de SHU no Brasil**

153 Dados epidemiológicos demonstram a ocorrência de diversos casos de SHU no
154 Brasil, no entanto, são poucas as associações da doença com alimentos envolvidos em
155 surtos no país (CVE/SP, 2011, SOUZA et al., 2011). Uma provável explicação para a
156 falta de associação da doença com surtos alimentares seria a não obrigatoriedade de
157 pesquisa da *E. coli* O157:H7 em alimentos envolvidos em surtos. Além disso, as
158 técnicas microbiológicas convencionais para *E. coli*, não são capazes de detectar *E. coli*
159 O157:H7 ou sua toxina Shiga (PIGATTO et al., 2009, XIONG et al., 2014), e os
160 métodos capazes para isso não estão implementados nos laboratórios Centrais
161 (LACENs).

162 Um estudo retrospectivo dos casos de SHU ocorridos no Hospital Universitário
163 de Santa Maria/RS, entre março de 1987 a agosto de 1999 apontou a existência de 25
164 casos de SHU em crianças, com idade entre dois meses a 57 meses. Contudo, não houve
165 comprovação do envolvimento da O157 nos referidos casos (BARCELOS et al. 2000).

166 No período de 1998 a julho de 2000, foram registrados 12 casos de SHU, com
167 histórico anterior de diarreia e de possível associação com a *E. coli* O157 de acordo
168 com os registros da AIH/DATASUS/MS, Estado de São Paulo, (EDUARDO, 2002),
169 sugerindo a presença da doença mas ainda sem a confirmação da presença do patógeno.

170 Em 2001 um menino de oito meses de idade foi admitido em hospital da cidade
171 de São Paulo, e após a análise do quadro clínico foi diagnosticado com HUS. Após o

172 diagnóstico amostras de fezes do paciente foram analisadas. Os resultados
173 demonstraram o isolamento de uma cepa de *E. coli* pertencente ao sorogrupo O26: H11.
174 Este foi o primeiro relato sobre o isolamento de uma cepa STEC em um paciente com
175 HUS no Brasil (GUTH et al., 2002).

176 Em Minas Gerais, a análise das características epidemiológicas, clínicas e
177 laboratoriais de casos registrados de SHU pelo Departamento de Nefrologia Pediátrica de
178 um hospital de Uberlândia, coletados entre janeiro de 1994 a janeiro de 2004,
179 demonstrou a possibilidade do diagnóstico de SHU como uma causa de insuficiência
180 renal na infância em ambas as formas típicas (pós-diarreia) e atípicas (BONETTI et al
181 2011).

182 Segundo os dados do boletim do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado
183 de São Paulo, de 1998 a 2011, foram observados 93 casos de SHU, as quais podem ter
184 sido causadas por medicamentos, doenças sistêmicas, hereditárias, infecções
185 relacionadas ou não à *E. coli*. Nesse mesmo período, de acordo com o boletim, foram
186 identificados laboratorialmente pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), 8 casos de *E. coli*
187 O157:H7 e destes, um, ocorrido em 2007, evoluiu para SHU (CVE/SES-SP, 2011).
188 Contudo, a origem desse microrganismo não foi confirmada como sendo de alimentos.

189 Em 2002, três cepas de STEC isoladas de fezes de pacientes, pelo Instituto
190 Adolfo Lutz (IAL) foram sorotipificadas e caracterizadas molecularmente. Uma delas,
191 de 1990, foi proveniente de um paciente HIV+, com 18 anos, outra de uma criança com
192 quatro anos e a última de um adulto apresentando diarreia sanguinolenta. As amostras
193 foram sorotipificadas como O157:H7 e caracterizadas molecularmente como
194 possuidoras dos fatores de virulência de EHEC, no entanto não foi possível estabelecer
195 relação com alimentos ou identificar a origem da infecção (IRINO, 2002).

196 Em outro estudo, analisando uma coleção de 39 cepas de STEC, isoladas de
197 pacientes com diarreia, no período de 1976 a 1999, em São Paulo, Vaz et al. (2004)
198 detectaram a predominância dos sorogrupos O111 e O26. Os sorotipos encontrados
199 neste estudo foram: O26:H11, O55:H19, O93:H19, O111:NM, O11:H11, O118:H16 e
200 O157:H7.

201 Souza et al, (2011) analisaram as características clínicas e microbiológicas
202 associadas com 13 casos de SHU pós-diarreicas identificados em unidades de terapia
203 intensiva pediátrica na cidade de São Paulo, ocorridos entre janeiro de 2001 a agosto de
204 2005. STEC foram isoladas a partir de três dos sete pacientes cujas culturas de fezes
205 renderam crescimento bacteriano, e os sorotipos identificados foram 26:H11, O157:H7
206 e O165:HNM. Segundo os pesquisadores a fonte de infecção foi não rastreada neste
207 estudo, contudo o consumo leite não pasteurizado ou carne mal cozida foram relatados,
208 podendo ser a principal causa de infecção na maioria dos casos estudados.

209 De acordo com dados do ano de 2001, foram isoladas duas *E. coli* O157:H7 de
210 pacientes com diarreia, residentes em Campinas/SP, um com história de ingestão de
211 hambúrguer e outro de carne moída. Entretanto, não foi possível a comprovação
212 laboratorial dos alimentos suspeitos, bem como não foi possível estabelecer a relação
213 entre os casos (CVE/SES-SP, 2011; LEITE, 2011).

214 Em 2012, a Vigilância Epidemiológica do município de Anápolis, Goiás,
215 notificou a suspeita clínica de um caso de SHU. Tratava-se de uma dona de casa, de 48
216 anos, internada no Hospital Evangélico de Anápolis apresentando quadro clínico
217 suspeito. Esse caso foi identificado a partir de amostras encaminhadas pelo Núcleo de
218 Vigilância Epidemiológica ao Laboratório de Saúde Pública "Dr. Giovanni Cysneiros" -
219 LACEN. O caso evoluiu para cura sem complicações. Os alimentos em investigação

220 como suspeitos de transmitir a doença foram queijo tipo frescal e garrafada de ervas
221 para emagrecer (CVS/SES-GO, 2013).

222 Apesar da existência dos vários relatos de alimentos investigados sem casos de
223 SHU, a única implicação de *E. coli* O157:H7 veiculada por alimentos descrita na
224 literatura é o caso de um surto com dois casos de diarreia, sem SHU, ocorrido em
225 Campinas, em 2001, supostamente causado por ingestão de carne mal cozida.
226 (CVE/SES-SP, 2011).

227 Pesquisas e isolamentos de *Escherichia coli* O157:H7 Brasil

228 No Estado de São Paulo, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7, foi isolada e
229 identificada pelo IAL, em 1997, a partir de uma amostra de água de poço, enviada para
230 análise pelo caseiro de uma chácara de Parelheiros - SP. Uma vez detectado este agente,
231 foi desenvolvido um trabalho interinstitucional envolvendo o IAL (Divisão de
232 Bromatologia e Química e Divisão de Biologia Médica), o Centro de Vigilância
233 Epidemiológica (CVE) "Prof. Alexandre Vranjac" (Divisão de Doenças de Transmissão
234 Hídrica), o Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e as Vigilâncias Epidemiológicas e
235 Sanitárias da Direção Regional de Saúde I (DIR I), do Estado de SP. Uma segunda
236 amostra de água do poço, assim como amostras de fezes humanas e de animais Peri-
237 domiciliares, foram analisadas, no entanto *E. coli* O157:H7 não foi encontrada nestas
238 amostras (KATSUYA et al,1998).

239 Silveira et al. (1999) pesquisaram a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em 886
240 amostras de hambúrgueres produzidos por oito fabricantes no sul e sudeste do Brasil,
241 entre janeiro e setembro de 1997. Em 17 (1,9 %) das amostras havia *E. coli* capazes de
242 aglutinar o antisoro para O157, porém testes posteriores demonstraram que não havia *E.*
243 *coli* O157:H7 em nenhuma das amostras.

244 Em 1999, *E. coli* O157:H7 foi isolada de três amostras coletadas em um
245 matadouro no estado do Rio de Janeiro/RJ. Das três amostras, uma foi de carne bovina e
246 as outras duas de fezes de gado leiteiro. Este foi o primeiro relato de *E. coli* O157:H7
247 isolado de gado leiteiro no Brasil (CERQUEIRA, 1999).

248 Irino et al. (2005) analisaram 153 amostras fecais de bovinos quanto a presença
249 de STEC através do isolamento em meio seletivo e produção de toxina Shiga (Stx)
250 através de ensaios de citotoxicidade em células Vero. As amostras foram selecionados
251 aleatoriamente a partir de seis fazendas leiteiras no Estado de São Paulo, Brasil e os
252 resultados demonstram a presença de 202 STEC, dentre elas duas *E. coli* O157:H7.

253 A presença de genes para a toxina Shiga (*stx*) em STEC foi investigada por
254 Leomil et. al. (2003) a partir de 344 amostras fecais de bezerros com e sem diarreia (n =
255 139, n = 205), provenientes de 12 fazendas de gado de corte do Estado de SP. Dentre
256 esses, 44 (12,7 %) animais foram positivos para *stx*. Os bezerros com diarreia tiveram
257 maior frequência de isolamentos de *stx* (28/139, 20 %) do que nos animais sem diarreias
258 (16/205, 7,8 %). Entre as cepas de STEC, foram identificados 16 sorovares, entre eles:
259 O111:NM (04 isolados), O111:H8 (02) e O118:H16 (01). O sorovar O157:H7 não foi
260 isolado nesse estudo.

261 Em 2003, outro estudo foi realizado a fim de investigar a presença de *E. coli*
262 O157:H7 em vegetais normalmente consumidos crus no Brasil. O estudo avaliou ainda
263 a resistência de uma cepa ATCC O157:H7 frente aos principais sanitizantes
264 disponíveis no mercado. Foram analisadas 869 amostras de vegetais, no entanto, não foi
265 detectada a presença de *E. coli* O157:H7, e os ensaios com a cepa padrão demonstraram
266 que os desinfetantes testados foram eficazes na desinfecção dos folhosos (SILVA, et al.
267 2003).

268 Durante 1999-2000, foi realizada uma investigação em 60 propriedades leiteiras
269 em Pelotas (RS) quanto a presença de *E. coli* verotoxigênicas. Nessa pesquisa, 1.127
270 isolados de *Escherichia coli* foram encontrados provenientes de 243 bovinos de leite,
271 água de consumo humano e animal e de amostras de leite. Os pesquisadores
272 demonstraram a presença de *E. coli* verotoxigênica em 95 % (57/60) das propriedades,
273 em 49 % (119/243) dos animais testados, em 5 % (3/60) das amostras de água de
274 consumo humano, em 8,35 % (5/60) das amostras de água de consumo animal e em 5 %
275 (3/60) das amostras de leite. Em 2,9 % (7/243) dos animais testados, foram isoladas
276 VTEC pertencentes aos sorogrupos O157, O91 e O112 (SANDRINI et al. 2007).

277 No Maranhão, no município São Luís, a ocorrência de STEC na microbiota
278 intestinal de bovinos destinados ao abate de foi avaliada através da pesquisa molecular
279 por PCR multiplex para os genes *stx1*, *stx2* e *eae*. Ao todo, 100 amostras de fezes foram
280 analisadas. O percentual de STEC isolado foi de 73 %. Os principais perfis genotípicos
281 de virulência detectados foram: *stx1/stx2* (68,8 %; 2), *stx1* (11,8 %) e *stx2* (8,6 %).
282 Poucas cepas de STEC (4,4 %) possuíam o gene *eaeA* em associação aos genes
283 *stx*. (SALES et al, 2006).

284 Em estudo mais recente, realizado na região de Ribeirão Preto, SP, Stella (2009)
285 analisou 473 cepas, a fim de caracterizar os principais fatores de virulência de cepas de
286 *E. coli* isoladas de leite, água e fezes de bovinos leiteiros, entre essas duas amostras de
287 fezes foram positivas para *E. coli* O157:H7.

288 Silveira (2010) analisou 95 amostras de carne moída coletadas em diferentes
289 municípios próximos a fronteira com o Uruguai e Argentina, a fim de investigar a
290 presença de *E. coli* O157:H7. Dentre essas amostras, três isolados foram identificados
291 como prováveis *E. coli* O157:H7, segundo os testes recomendados pelo USDA/FSIS,

292 porém após a caracterização genotípica por PCR - multiplex, investigando genes de
293 virulência (*rfbO157*, *stx1* e *stx2*), no Laboratório de referência para a vigilância regional
294 de HUS e diarreias sanguinolentas no cone sul, do Ministério da Saúde da Argentina
295 (INEI-ANLIS), os resultados apontaram que os três isolados não foram classificados
296 como *E. coli* O157:H7.

297 9. Loiko (2013) analisou 108 amostras de carcaças bovinas em um
298 matadouro frigorífico exportador do sul do Brasil. A presença de 22 cepas de *E. coli*
299 O157:H7 foi detectada, sendo que 6 perfis de PFGE foram identificados entre elas. A
300 resistência a antimicrobianos também foi analisada, revelando multirresistência frente a
301 vários antimicrobianos testados. Dentre as cepas identificadas, uma delas apresentou o
302 mesmo perfil genotípico e fenotípico de uma cepa de *E. coli* O157:H7 causadora de
303 infecção alimentar na Argentina, isolada no ano de 2005 naquele país.

304 Em 2013, um estudo analisou 100 carcaças bovinas em um frigorífico
305 exportador, localizado no interior do estado de São Paulo. Neste estudo não foi
306 detectada a presença de *E. coli* O157 em nenhuma das amostras (MATOS et al., 2013).

307 Outro estudo em SP analisou a ocorrência de *E. coli* O157: H7 em amostras de
308 retalhos de carne e de carcaças de bovinos terminados em pastagem ou em
309 confinamento. Desses mesmos animais foram colhidas, também, amostras de suabe retal
310 para a detecção experimental de *E. coli* O157: H7. Um total de 100 suabes retais, 100
311 amostras de carcaças coletadas antes do resfriamento, e 323 amostras de aparas de carne
312 foram analisados. Segundo os pesquisadores, uma amostra de retalhos de carne foi
313 positiva para *E. coli* O157: H7.

314 10. Em um estudo recente, Rodrigues et al. (2014) isolaram duas
315 amostras de *E. coli* O157:H7 a partir de água de irrigação e água de lavagem de alfaces,
316 em uma pequena propriedade de cultivo orgânico, no sul do Brasil.

317 11. **CONCLUSÃO**

318 Uma vez que não existem dados sistematizados sobre *E. coli* O157:H7 no Brasil
319 e nem casos de SHU, a ocorrência cada vez mais frequente de isolamentos a partir de
320 amostras de alimentos e reservatório animal, e apesar de haver apenas uma referência de
321 envolvimento da mesma em surtos alimentares, estes dados são um forte indício de que
322 surtos envolvendo *E. coli* O157:H7, poderão ser reportados em breve no país assim
323 como ocorre em diversos países no mundo.

324 Este patógeno é extremamente virulento, e quando uma infecção é estabelecida,
325 o desenvolvimento de sua manifestação mais grave, a síndrome uremica hemolítica, não
326 pode ser prevenida. Tendo em vista que, a transmissão ocorre por diversas rotas, é
327 necessário a adoção de distintas barreiras a fim de prevenir a transmissão do mesmo. A
328 adoção de medidas como pasteurização de leite, cloração da água, higienização de folhosos
329 e cozimento adequado de produtos carneos são medidas de extrema importância na
330 prevenção de surtos alimentares causados por *E. coli* O157:H7. No entanto, uma vez
331 que, existem relatos da presença do microrganismo em ambientes industriais a lavagem
332 das mãos e as boas práticas de trabalho a fim de impedir a contaminação cruzada
333 também são essenciais, pois o microrganismo pode passar pelos métodos de detecção e
334 sistemas de inspeção tradicionais sem ser detectado.

335 Além dos cuidados, a fim de evitar a contaminação, estratégias para diagnóstico
336 rápido em caso de surtos devem também serem adotadas, devido à gravidade das
337 complicações que muitas vezes acompanham infecções causadas por *E. coli* O157:H7,

338 destaca-se a necessidade de uma vigilância ativa e a implantação protocolos de detecção
339 em laboratórios de microbiologia das áreas clínicas e de alimentos.

340 Além disso, a instrumentação dos laboratórios e padronização das técnicas de
341 detecção se fazem necessários, a fim de, possibilitar a pesquisa rotineira deste patógeno
342 no Brasil. Conclui-se ainda que, dado o grande número de ocorrências de casos clínicos,
343 caso a investigação de *E. coli O157:H7* passe a ser obrigatória em alimentos, no caso de
344 ocorrências DTA, como já ocorre em países como Estados Unidos e Argentina, o
345 número de casos positivos para o isolamentos de *E. coli O157:H7* torne-se significativo
346 e mais próximo do número de ocorrências de casos clínicos de pacientes com
347 sintomatologia compatível com doenças causadas por este patógeno.

348 Destaca-se ainda, que estudos epidemiológicos para avaliação de risco, bem
349 como estudos para caracterização de isolados de *E. coli O157:H7* encontrados no Brasil
350 são importantes, pois através desses dados é possível determinar a incidência e
351 distribuição do patógeno, bem como os possíveis reservatórios, e estabelecer pontos de
352 referência para a implantação de um sistema adequado de vigilância e prevenção.

353 **REFERÊNCIAS**

354 ACKERS, M.L. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated
355 with leaf lettuce consumption. **The Journal of Infectious Disease**, v.177, p.1588 -
356 1593, 1998.

357 AZAGRA, A.M.; IGLESIAS, M. I. Síndrome hemolítico urémico. **An Pediatr Contin.**,
358 v.7, p. 79-88 79, 2009.

359 BARCELOS, A.L. et al. Síndrome hemolítico-urêmica: análise retrospectiva de 25
360 casos. Serviço de Nefrologia e Serviço de Pediatria. Hospital Universitário de Santa
361 Maria/UFSM, 2000.

362 MARLER, B. *In:Poisoned: The True Story of the Deadly E. Coli Outbreak That*
363 **Changed the Way Americans Eat.** BENEDICT, J. Inspire Books , 2011.

364 BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga
365 (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências**
366 **Biológicas e da Saúde**, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

367 BETTELHEIM et al. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia*
368 *coli*; under-rated pathogens. **Crit. Rev. Microbiol.** v.33, p. 67–87, 2007.

369 BONETTI, V. et al. Hemolytic-Uremic Syndrome in Uberlândia, MG, Brazil.
370 **International Scholarly Research Network - ISRN Pediatrics.** Volume 2011, Article
371 ID 651749, 2011. Disponível em:
372 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263568/>>. Acesso em: junho de
373 2012.

374 BLANCO, J.E. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin
375 (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in
376 Lugo (Spain) from 1992 through 1999. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, p.311-
377 319, 2004.

378 CERQUEIRA A. M.F., et al. High occurrence of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*
379 (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet Microbiol.**;90(1-2):111-21,
380 1999.

381 CDC- CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. Update: Multistate outbreak of
382 *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers—western United States, 1992–
383 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, p.258–263, 1993.

384 CDC- CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. Outbreaks of *Escherichia coli*
385 O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-

386 july 1997. **The Journal of the American Medical Association**, v.278, p.809-810,
387 1997.

388 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, USA. **FoodNet 2006 surveillance**
389 **report**. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009.

390 CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL, USA. **Multistate Outbreak of *E. coli***
391 **O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce**.Disponível em:
392 <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>. Acesso
393 em: 02 junho, 2012.

394 CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE – SP. **Casos confirmados e**
395 **coeficientes de incidência de casos autóctones de doenças de notificação**
396 **compulsória no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2011**. Disponível
397 em:<http://www.cve.sp.gov.br/> Acesso em: 06 de junho de 2012.

398 CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - Secretaria de Saúde do Estado de
399 Goiás. - (2013). Ocorrência de Síndrome Hemolítico-Urêmica. *In:INFORME*
400 **TÉCNICO N.º 02/ 2013**. Disponível em:
401 <[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2013-08/informe-sindrome-hemolitica-](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2013-08/informe-sindrome-hemolitica-uremica-2013.pdf)
402 [uremica-2013.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2013-08/informe-sindrome-hemolitica-uremica-2013.pdf)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2014.

403 EDUARDO, M.B. et al. 2002. **Síndrome Hemolítico Urêmica-Normas e Instruções**.
404 São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São
405 Paulo. Disponível em: <http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso
406 em: 21 mar. 2006.

407 EFSA (European Food Safety Authority). Technical specifications for the monitoring
408 and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC

409 surveys on animals and food) on request of EFSA. Summary. EFSAJ. V.7, p.1366,
410 2009.

411 FARROKL et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their
412 significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162,
413 p.190–212, 2013.

414 FENG, P. et al. **Diarrheagenic *Escherichia coli***. In: **Chapter 4A, Bacteriological**
415 **Analytical Manual on line**. Food and Drug Administration – FDA/CFSAN 2011.
416 Disponível
417 em:<[http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAn](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm)
418 [alyticalManualBAM/ucm070080.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm)> Acesso em: 15 junho 2012.

419 FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos** United Kingdon,
420 Wiley-Blackwell, 2º ed., p.496, 2013.

421 GANNON, V.P. et al. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays
422 and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains.
423 **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.3, p. 656 – 662, 1997.

424 GUTH, B.E. et al. First shiga toxin-producing *E. coli* isolate from a patient with
425 hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging and Infectious Diseases**, v.8, p.535-
426 536, 2002.

427 IRINO, K. et al. O157:H7 shiga toxin-producing *E. coli* strains associated with sporadic
428 cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.8, n.4, p.446-
429 447, 2002.

430 IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia*
431 *coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary**
432 **Microbiology**, v.105, n.1, p.29-36, 2005.

433 JOHNSON et al. The emerging clinical importance of non-O157 Shigatoxin-producing
434 *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.** v. 43, p.1587–1595, 2006.

435 KATSUYA, E.M. et al. *Escherichia coli* O157:H7, um enteropatógeno emergente.
436 **Revista CIP**, Ano 1, n. 1, p. 7- 8, 1998.

437 LAEGREID, W.W. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves
438 at weaning. **Epidemiology Infection**, v.123, p.291-298, 1999.

439 LEITE, et al. *Escherichia coli* Enterohemorrágica O157:H7. In: **Manual de Zoonoses**,
440 1ª ed. VII.2011.

441 LEOMIL, L. et al. Frequency of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates
442 among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet Microbiol.** Dec 2;97(1-2):103-
443 9, 2003

444 LOIKO, M. R. Quantificação de micro-Organismos indicadores e caracterização de
445 *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de
446 bovinos no Rio Grande do Sul. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação
447 em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) - Instituto de Ciência e Tecnologia
448 de Alimentos – UFRGS. 2013.

449 MATHUSA, E.C. et al. Non-O157 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in foods. **J.**
450 **Food Prot.** v.73, p. 1721–1736, 2010.

451 MELLMANN, A. et al. Phylogeny and disease association of Shiga toxin–producing
452 *Escherichia coli* O91. **Emerg. Infect. Dis.** v. 15, p. 1474–1477, 2009.

453 MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V.M. *Escherichia coli* enterohemorrágica
454 (EHEC) O157:H7 – revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n.3,
455 p.175-82, 2006.

456 MORGAN, D. et al. First recognized community outbreak of haemorrhagic *colitis* due
457 to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and**
458 **Infection**, v.101, p.83-91, 1988.

459 MORELLI, A.M.F. *Escherichia coli* O157:H7: Ocorrência em Ambiente de Produção
460 de Leite na Microrregião de Viçosa, Adesão em Diferentes Superfícies e Resistência a
461 Sanitizantes. **Tese (Doutorado)**, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
462 de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

463 MATOS, A. V.R. et al. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e
464 microrganismos indicadores em carcaças bovinas para exportação. **Arq. Bras. Med.**
465 **Vet. Zootec.**, v.65, n.4, p.981-988, 2013.

466 NATARO J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology**
467 **Reviews**, p. 142–201, 1998.

468 PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing
469 *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews** v.11, p. 450 – 479, 1998.

470 PENNINGTON. H. *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 376, p.1428–35, 2010.

471 PIANCIOLA, et al. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that
472 cause diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome in Neuquén, Argentina. **International**
473 **Journal of Medical Microbiology**, In Press, Accepted Manuscript, 2014. Disponível
474 em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422114000216#>>. Acesso
475 em: 12 de fevereiro 2014.

476 PIGATTO, C.P. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC)
477 não-O157 em queijo Tipo Minas Frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p.
478 663-668, 2009.

479 RILEY, L.W. et al. Hemorrhagic *colitis* associated with a rare *Escherichia coli*
480 O157:H7 serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, p.681–685, 1983.

481 RIVAS, M. et al. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin–producing *Escherichia coli*
482 Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, 763,
483 2008.

484 RODRIGUES, R.Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of
485 good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food**
486 **Control**, 42, p. 152-164, 2014.

487 SALLAM, K.I. et al. Prevalence, genetic characterization and virulence genes of
488 sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- and *E. coli* O157:H7 isolated from retail
489 beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, p. 295–301, 2013.

490 SALES, S.S. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxinas "Shiga" (STEC)
491 na microbiota intestinal de bovinos destinados ao abate no município de São Luís - MA
492 / Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 101 (559-560) 245-251, 2006.

493 SÁNCHEZ et al. Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia coli*
494 O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**
495 **Clínica**, v. 28, p. 370–374, 2010.

496 SANDRINI, C.N.M. et al. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em
497 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.
498 37, n.1, p. 175- 182, 2007.

499 SHERE, J.A. et al. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on
500 four dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64,
501 p.1390-1399, 1998.

502 SCHAFFZIN et al. Public health approach to detection of non-O157Shigatoxin-
503 producing *Escherichia coli*: summary of two outbreaks and laboratory procedures.
504 **Epidemiol. Infect.** V.140, p.283–289, 2012.

505 SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* em vegetais e resistência aos agentes
506 de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2,
507 p. 167-173, 2003.

508 SILVEIRA, N.F.A, et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers
509 produced in Brazil. **J Food Prot**, v. 62, p.1333-1335, 1999.

510 SILVEIRA, J.B. Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída no estado
511 do Rio Grande do Sul, Brasil. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação
512 em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) – Instituto de Ciência e Tecnologia
513 de Alimentos (UFGRS), 2010.

514 SOUZA, R.L. et al. Hemolytic Uremic Syndrome in Pediatric Intensive Care Units in
515 São Paulo, Brazil. **The Open Microbiology Journal**, 5, (Suppl 1-M5) 76-82, 2011.

516 STELLA, A.E. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de
517 amostras de Água, leite e fezes de bovinos leiteiros da Região de ribeirão Preto-SP,
518 Brasil. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de
519 Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal– São Paulo, 2009.

520 USDA (United States Department of Agriculture). ***E. coli* O157:H7: issues and**
521 **ramifications**. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 1994, 48p.

522 WATANABE, Y.; OZASA, K. An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia*
523 *coli* O157:H7 infection. **Rinsho Byori**, Osaka, v.45, p.869-874, 1997.

524 XIONG, Q. et al. Development of an immunomagnetic separation method for efficient
525 enrichment of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, v. 37, p. 41-45, 2014.