



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

LUCIANA JUSTO BESERRA

COMPORTAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA DO
SOROTIPO O113:H21 FRENTE A ATIVIDADE DE ÁGUA, pH, TEMPO E TEMPERATURA

NITERÓI/ RJ
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA JUSTO BESERRA

COMPORTAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA DO
SOROTIPO O113:H21 FRENTE A ATIVIDADE DE ÁGUA, PH, TEMPO E TEMPERATURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bacteriologia.

Orientadores: Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira

Prof^ª. Dr^ª. Alice Gonçalves Martins Gonzalez

NITERÓI/ RJ
2010

LUCIANA JUSTO BESERRA

COMPORTAMENTO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA DO
SOROTIPO O113:H21 FRENTE A ATIVIDADE DE ÁGUA, pH, TEMPO E TEMPERATURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bacteriologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aloysio de Melo Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Kátia Gomes de Lima Araújo
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel
Universidade Federal do Rio de Janeiro

NITERÓI/ RJ
2010

Dedico esta vitória

*Aos meus amados pais Maridãoio e Luci,
meus primeiros educadores,
e a minha querida irmã e amiga, Fernanda.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me iluminado durante toda a caminhada e pelos momentos de dificuldades superados.

Ao meu namorado Jairo Rosa, por todas as palavras positivas e incentivo nas horas em que mais precisei. O seu companheirismo foi único!

Aos meus orientadores Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira e Alice Gonçalves Martins Gonzalez, pela confiança e suporte durante toda a jornada.

Um agradecimento especial aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Joyce Bezerra, Rosa Renata, Jezieli Braz e à Beatriz Corrêa do Laboratório de Bromatologia, que sempre estiveram presentes, ajudando nos meus experimentos.

Aos técnicos Lúcia Helena de Almeida e Ademir Souza de Oliveira, amizades que conquistei durante estes dois anos, pela colaboração e companheirismo.

Ao professor Joel Maurício Corrêa da Rosa, que por vezes esclareceu minhas inúmeras dúvidas de estatística.

Agradeço à prof^a. Kátia Lima pela ajuda na parte de Tecnologia de Alimentos e análise dos dados.

À prof^a. Raquel Bonelli pelo suporte durante a redação da dissertação.

À psicóloga Cláudia Machado, por toda a prestatividade e amizade.

À minha prima Maíra Justo, pelo grande incentivo.

Às minhas amigas Maria Carolina de Souza dos Santos e Livia Chicayban, pelo apoio e ajuda fundamental para a redação dessa dissertação e o alcance desta vitória.

À Rosi, grande amiga que sempre me incluiu em suas orações.

À toda a família, pela força e aos amigos que sempre me confortaram.

À Faperj pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que tiveram participação direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse concluído.

MUITO OBRIGADA!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final."*

Martin Luther King

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p.19

2 REVISÃO DA LITERATURA, p.22

2.1 Doenças transmitidas por alimentos, p.22

2.2 *Escherichia coli*, p.22

2.3 *E. coli* produtora de toxina Shiga, p.24

2.4 Virulência de STEC, p.24

2.5 Fatores que afetam o desenvolvimento de *E. coli* em alimentos, p.26

2.6 Transmissão de STEC, p.27

2.7 Contaminação de STEC em leite e derivados, p.29

2.8 STEC do sorotipo O113:H21, p.32

3 OBJETIVOS, p. 34

4 MATERIAIS E MÉTODOS, p.35

4.1 Cepas utilizadas, p.35

4.2 Procedimentos, p.37

4.2.1 Avaliação das variáveis pH, tempo, temperatura e Aa no comportamento de STEC O113:H21 em soro de QMF, p.37

4.2.2 Padronização do inóculo, p.38

4.2.3 Desenho experimental, p.40

4.2.4 Contagem de células viáveis, p.42

4.3 Análise estatística, p.43

5 RESULTADOS, p.44

5.1 Cepas EC 784 (carne bovina), p.44

5.2 Cepas 1108/1 (humana), p.50

5.3 Cepas 702/1 (bovina), p.56

5.4 Cepas de coliforme termotolerante, p.59

5.5 Cepas DH5 α , p.65

5.6 Comparação entre as cepas estudadas, p.71

6 DISCUSSÃO, p.72

7 CONCLUSÕES, p.77

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1.** Composição dos principais produtos lácteos, p.31
- Tabela 2.** Características fenotípicas e genotípicas das cepas estudadas (EC 784, 1108/1 e RJ 702/1), p.36
- Tabela 3.** Modelo para a construção da matriz de experimentos fatorial fracional (3^{4-1}) utilizado para avaliar o comportamento das cepas bacterianas em estudo sob o efeito de quatro fatores em três diferentes níveis, p.40
- Tabela 4.** Desenho experimental fatorial fracional (3^{4-1}) utilizado para avaliar o comportamento das cepas bacterianas em estudo sob o efeito de quatro fatores em três diferentes níveis, p.41
- Tabela 5.** Contagem de células viáveis (UFC/mL) de STEC EC 784 a partir dos 81 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4, p.45
- Tabela 6.** Contagem de células viáveis (UFC/mL) de STEC 1108/1 a partir dos 81 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4, p.51
- Tabela 7.** Contagem de células viáveis (UFC/mL) de RJ 702/1 a partir dos 81 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4, p.57
- Tabela 8.** Contagem de células viáveis (UFC/mL) de coliforme termotolerante a partir dos 81 experimentos em soro de QMF, p.60
- Tabela 9.** Contagem de células viáveis (UFC/mL) de DH5 α a partir dos 81 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4, p.66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma da produção de QMF e dessoragem, p.37
- Figura 2.** Etapas de padronização do inóculo e inóculo em soro de QMF, p.39
- Figura 3.** Figura esquemática das diluições e inoculações para a contagem de células viáveis, p.42
- Figura 4.** Gráfico de Pareto para os efeitos dos quatro fatores estudados (pH, temperatura, tempo e Aa) sobre a cepa EC 784, p.46
- Figura 5.** Equação gerada a partir do modelo de regressão estabelecido para a cepa EC 784, p.46
- Figura 6.** Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa EC 784, p.47
- Figura 7.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 7 e temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa EC 784, p.48
- Figura 8.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de pH 7 e Aa de 0,94 sobre comportamento da cepa EC 784, p.49
- Figura 9.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,94 e temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa EC 784, p.50
- Figura 10.** Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa 1108/1, p.52
- Figura 11.** Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa 1108/1, p.52
- Figura 12.** Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa 1108/1, p.53
- Figura 13.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 7 e temperatura de 8°C sobre comportamento da cepa 1108/1, p.54
- Figura 14.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,96 e pH 7 sobre comportamento da cepa 1108/1, p.55

- Figura 15.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,96 e temperatura de 8°C sobre comportamento da cepa 1108/1, p.56
- Figura 16.** Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa RJ 702/1, p.58
- Figura 17.** Gráfico de resíduo da relação dos valores observados e previstos para a cepa RJ 702/1, p.58
- Figura 18.** Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa coliforme termotolerante, p.61
- Figura 19.** Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa de coliforme termotolerante, p.61
- Figura 20.** Gráfico de resíduo da relação dos valores observados e previstos para a cepa de coliforme termotolerante, p.62
- Figura 21.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,96 e 35°C sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante, p.63
- Figura 22.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,96 e pH 6 sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante, p.64
- Figura 23.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 6 a temperatura de 35°C sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante, p.65
- Figura 24.** Gráfico de Pareto para os efeitos dos quatro fatores estudados (pH, temperatura, tempo e Aa) sobre a cepa DH5 α , p.67
- Figura 25.** Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa DH5 α , p.67
- Figura 26.** Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa DH5 α , p.68
- Figura 27.** Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,94 e pH 5 sobre comportamento da cepa DH5 α , p.69

Figura 28. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 5 a temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa DH5 α , p. 70

Figura 29. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,94 a 26°C sobre comportamento da cepa DH5 α ,p.71

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

Aa	atividade de água
A/E	lesão “attaching and effacing”
ANLIS	“Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “
AP	aderência periférica
BG	produção de β -D-glucuronidase
Caco-2	linhagens de células de adenocarcinoma humano
CH	colite hemorrágica
DAEC	<i>E. coli</i> que apresenta aderência difusa
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	densidade óptica
DVA	doenças veiculadas por alimentos
<i>eae</i>	gene codificador da intimina
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC/STEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
Ehly	enterohemolisina de STEC
<i>ehxA</i>	gene codificador da enterohemolisina
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EspP	serina protease extracelular
<i>espP</i>	gene que codifica a serina protease
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FS	fermentação de sorbitol
g	grama / força gravitacional

h	hora
HCT-8	tipo celular de câncer humano
HEp-2	linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano
HUS	síndrome urêmica hemolítica
ICMSF	“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
<i>iha</i>	gene cromossômico de adesão
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial
L	efeito linear
LEE	“locus of enterocyte effacement”
LHIMA	Laboratório de Higiene e Controle Microbiológico de Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDa	mega Dalton
μL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimolar
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
M	molar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-D	“Dulbecco’s phosphate buffered saline”
pH	potencial de hidrogênio livre
PTT	púrpura trombocitopênica trombótica
Q	efeito quadrático
QMF	queijo Minas Frescal
q.s.p.	quantidade suficiente para
r	correlação de Pearson
R ²	coeficiente de determinação
RJ	Rio de Janeiro
RNA	“ribonucleic acid” - ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
<i>rpoS</i>	gene que codifica o fator Sigma
RpoS	fator Sigma

Saa	adesina autoaglutinante de STEC
SLT	“Shiga like toxin”
<i>spot</i>	forma de inoculação
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	toxina Shiga
Stx1	toxina Shiga -1
Stx2	toxina Shiga -2
<i>stx</i>	gene que codifica Stx
<i>stx</i>	gene que codifica Stx1
<i>stx2</i>	gene que codifica Stx2
T	tempo
t	temperatura
TIR	“translocated intimin receptor”
<i>tir</i>	gene codificante da proteína TIR
TSA	agar tripticase de soja
TSB	caldo triptase de soja
UFC	unidade formadora de colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UV	ultravioleta
VERO	célula de rim de macaco verde africano
VT	verotoxina

RESUMO

Cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O113:H21 tem sido isoladas de casos esporádicos e surtos de doença humana em vários países do mundo. Os alimentos de origem bovina como carne, leite e derivados representam o principal veículo de transmissão de STEC. O presente estudo teve como objetivo analisar o comportamento de STEC pertencente ao sorotipo O113:H21, isoladas de carne bovina, fezes humana e bovina, e comparar com o comportamento de *E. coli* coliforme termotolerante e *E. coli* DH5 α , frente a diferentes níveis de pH, temperatura, tempo e Aa nas condições que simulam produtos lácteos. Como substrato, utilizou-se o soro de queijo minas frescal com as variáveis ajustadas para mimetizar as condições presentes nos produtos lácteos. O efeito das quatro variáveis independentes (pH, Aa, tempo e temperatura) sobre a resposta (população bacteriana) foi aferido através da análise multivariada, utilizando-se um planejamento experimental do tipo “central composite design”, gerado pelo software Statistica 7 (StatSoft, OK, USA). Tal planejamento envolveu a combinação dos quatro fatores gerando 27 testes, com duas repetições autênticas dos experimentos. Os níveis empregados para as variáveis foram pH (5, 6 e 7), Aa (0,92, 0,94 e 0,96), tempo (0, 7 e 15 dias) e temperatura (8, 26 e 35°C). O programa estatístico permitiu a construção de uma equação que modela o comportamento bacteriano. Com exceção da cepa bovina RJ 702/1, a equação gerada para as outras cepas apresentou coeficiente de determinação (R²) acima de 0,7, demonstrando o ajuste do modelo. A equação descreveu a variação da contagem microbiana em função das variáveis estudadas. Todas as variáveis apresentaram efeito significativo, individual e combinado, sobre o comportamento das STEC O113:H21 estudadas, porém as interações apresentaram baixa intensidade. O tempo foi a variável que mais contribuiu para a redução da população bacteriana das cepas incluídas no estudo. Os resultados apresentados pelos gráficos de superfície sugerem que as cepas EC 784 e 1108/1 podem apresentar habilidade de sobreviver em produtos lácteos como queijo minas frescal (pH: 6,4; Aa \geq 0,98), queijo prato (pH: 5,2 a 5,4 ; Aa: 0,94 a 0,96) e iogurte (pH: 5,0; Aa: 0,97) em um período de 4 a 5 dias na faixa de temperatura de armazenamento avaliada no estudo (8°C a 35°C). A cepa de coliforme termotolerante manteve-se viável por mais tempo, em um período de 15 dias nessas mesmas condições. Já a cepa laboratorial *E. coli* DH5 α não apresentou habilidade de sobrevivência nesses produtos. Os resultados obtidos e analisados em conjunto indicam que as cepas pertencentes ao sorotipo O113:H21, nas condições avaliadas, não apresentam comportamento diferente da cepa de coliforme termotolerante, e que produtos lácteos apresentam-se como veículo em potencial de STEC O113:H21.

Palavras-chave: STEC O113:H21, sobrevivência, produtos lácteos.

ABSTRACT

Strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of serotype O113:H21 have been isolated from sporadic cases and outbreaks of human disease in several countries worldwide. Foods of origin bovine such as meat, raw milk and dairy products represent the main transmission vehicle of STEC. The present study aimed to analyze the behavior of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of serotype O113:H21 isolated from meat, human and calves feces and compare to the behavior of *E. coli* thermotolerant coliform and *E. coli* DH5 α against different levels of pH, temperature, time and water activity - A_w to mimic the conditions found in dairy products. As substrate, the whey of soft cheese was used with the variables set to mimic the conditions present in dairy products. The effect of the four independent variables (pH, temperature, time and water activity) on the response (bacterial population) was assessed by central composite design, using a type of planning experimental factorial design, created by the software Statistica 7 (StatSoft, OK, USA). The experimental plan involved the combination of factors generating 27 tests, with two authentic replications of the experiment. The levels used for the variables were pH (5, 6 and 7), A_w (0.92, 0.94 and 0.96), incubation period (0, 7 and 15 days), and temperature (8, 26 and 35°C). The statistical program allowed the construction of an equation that models the behavior of bacteria. With the exception of cattle strain RJ 702 / 1, the equation generated for the other strains showed determination coefficient above 0.7, demonstrating the fit of the model. The equation described the variation of the microbial count in function of the variables. All variables showed significant effect, individually and combined, on the behavior of STEC O113: H21 studied, but the interactions showed low intensity. The time was the variable that most contributed to the reduction of the bacterial population of the strains included in the study. The results presented by the graphs of the surface suggest that the strains EC 784 and 1108 / 1 may have the ability to survive in dairy products like fresh cheese (pH: 6.4; A_a 0.96), cheese (pH: 5.0 ; A_a : 0.97) and yogurt (pH: 5.0; A_a : 0.97) at a time 4-5 days in storage temperature range evaluated in the study (8 ° C to 35 ° C). The strain of thermotolerant coliform bacteria remained viable for longer in a period of 15 days in these conditions. Already the laboratory strain *E. coli* DH5 α showed no ability to survive in such products. The results obtained and analyzed together indicate that strains belonging to serotype O113: H21, under the conditions evaluated, no different from the strain of fecal coliform, and dairy products that present themselves as potential vehicle for STEC O113: H21.

Keywords: STEC O113:H21, survival, dairy products.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos patótipos de *Escherichia coli*, destaca-se a *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), considerada um patógeno emergente responsável por gastroenterites e suas complicações como a colite hemorrágica (CH), síndrome urêmica hemolítica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). SHU pode gerar um quadro de falência renal aguda, principalmente em crianças, sendo importante causa de transplante renal e, em alguns casos, pode gerar o óbito (BLANCO et al., 2003).

É amplamente reconhecido que alimentos de origem animal constituem a via mais importante de transmissão de STEC a humanos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005), já que bovinos são considerados o principal reservatório animal (GUDONG; ZHAO; DOYLE, 1996).

Ao se considerar as potenciais vias de transmissão em nosso meio, é pertinente assinalar o leite cru, que no Brasil, é produzido em situações de higiene nem sempre adequadas, podendo, desta forma, representar risco à saúde pública. Esse problema é agravado pela comercialização informal deste ou de seus derivados, particularmente o queijo Minas Frescal (QMF), produto consumido em larga escala pela população brasileira (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; BULHÕES; ROSSI JÚNIOR, 2002). O extensivo comércio de produtos lácteos no Brasil sem a devida fiscalização e o aumento do consumo desses produtos são questões que devem ser avaliadas, pelo risco de contaminação por STEC e outros patógenos.

Surtos de STEC foram relatados a partir do consumo de produtos lácteos (NATARO; KAPER, 1998; HUSSEIN; SAKUMA, 2005). Destaca-se o consumo de iogurte (MORGAN

et al., 1993) e queijos (CDSC, 1998; REID, 2001) como importantes veículos de transmissão desse patógeno.

Embora pesquisas constatem uma elevada ocorrência de STEC O113:H21 em bovinos no Brasil (YANO et al., 1986; GONZALEZ, 2003; TRISTÃO et al., 2007) e dada a importância de STEC na indústria de laticínios, a literatura nesta área ainda carece de pesquisas acerca da transmissão desses microrganismos por produtos de origem animal em nosso país, como carne, leite e seus derivados. Por mais que poucos casos de doenças humanas associados à STEC tenham sido descritos no Brasil, é grande a ocorrência deste patógeno em nosso rebanho bovino. Há ainda a proximidade com a Argentina, país onde a SHU é endêmica (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007), o que pode ter influência dos hábitos alimentares característicos do país como o consumo extensivo de carne mal cozinha, carne preparada em domicílio, além de preparações a base de caldo de carne (RIVAS et al., 2008).

Não há relatos de contaminação por STEC em nenhum tipo de queijo no Brasil. Porém, em outros países, pesquisas demonstraram a contaminação desse microrganismo nesses produtos. A sobrevivência de STEC O157:H7 em diferentes tipos de queijos foi demonstrada por LEUSCHNER; BOUGHTFLOWER (2002). O primeiro surto por *E. coli* O157:H7 no Canadá em queijo gouda não pasteurizado foi relatado por HONISH et al. (2005). Na Alemanha, WERBER et al. (2008) relataram similaridade em 81% do sorotipo O113:H21 isolados de pacientes e alimentos, dentre eles leite e queijos.

O iogurte é um produto lácteo que deve ser considerado como importante fonte de contaminação por STEC. MORGAN et al. (1993) relataram a ocorrência de 16 casos de infecção por O157:H7 na Inglaterra, incluindo 5 casos de SHU decorrentes do consumo de iogurtes.

Nesse contexto, torna-se importante o estudo das interações entre os fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a capacidade de sobrevivência dos microrganismos nos alimentos (NAKASHIMA et al., 2000). Cada tipo de microrganismo possui características próprias, em condições específicas. Desta forma, os produtos lácteos, em especial o QMF com sua atividade de água elevada (0,96), pH em torno de 6,4 (CARVALHO, 2003) e disposição de nutrientes favorece a contaminação microbiana, o que leva esse produto a possuir uma vida de prateleira menor do que outros alimentos, ou seja, em menos de 7 dias o produto já possui características sensoriais (sabor, consistência, aroma) comprometidos. Contudo, alguns autores apontam tempo de prateleira de QMF por 15 dias ou mais (CAMPOS et al., 2006).

Modelos matemáticos são muito utilizados pela microbiologia preditiva, um ramo eminente da microbiologia que integra a quantificação de microrganismos de alimentos e a tentativa de prever seu comportamento, quando variáveis controladoras de crescimento são utilizadas e ou alteradas (SILVA, 2006). A necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado a aplicação da microbiologia preditiva (NAKASHIMA,2000).

Desse modo, este estudo teve o objetivo de caracterizar o comportamento de STEC O113:H21 frente aos fatores intrínsecos e extrínsecos como pH, Aa, tempo e temperatura, simulando condições semelhantes aos principais produtos lácteos, uma vez que, pesquisas sobre a influência desses fatores geralmente só são documentadas em relação ao principal sorotipo envolvido em infecções por STEC, *E. coli* O157:H7. Além disso, não foram encontrados relatos referentes ao sorotipo O113:H21.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1984) “a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar” (BOULOS, 1999, p. 21). As doenças veiculadas por alimentos (DVA) têm sido reconhecidas como o problema de saúde pública mais abrangente no mundo atual e causa importante de diminuição de produtividade e perdas econômicas que afetam países, empresas e consumidores (TAUXE et al., 2009). Adicionalmente, BUZBY; ROBERTS (2009) relatam que infecções do trato gastrointestinal, especificamente todas as de origem alimentar e teoricamente evitáveis, são consideradas despesas para a economia mundial.

Um alimento é considerado seguro quando não apresenta nenhum tipo de risco à saúde de quem o consome, ou seja, livre de contaminações físicas, químicas e microbiológicas (TOLEDO, 2001). A contaminação microbiológica é responsável pelas DVA, podendo ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva pela falta de cuidados durante o preparo (PEREIRA, 2005).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram negativo, móvel ou imóvel, anaeróbio facultativo presente em grande número no intestino grosso de mamíferos e aves domésticas e selvagens, onde desempenha, como espécie comensal da microbiota, um importante papel na fisiologia digestiva (LEVINE et al., 1987).

Estes microrganismos apresentam antígenos somáticos (antígeno O) relacionados com polissacarídeos da membrana externa, que caracterizam vários sorogrupos, antígenos flagelares (antígenos H), relacionados com proteínas dos flagelos e, ainda, antígenos capsulares (antígenos K), relacionados com polissacarídeos da cápsula, compondo um grande número de sorotipos (WHITTAM et al., 1993).

O papel de *E. coli* como microrganismo indicador do grupo coliforme já é há muito tempo bem estabelecido. *E. coli*, por ser habitante exclusiva do trato gastrointestinal, uma vez detectada no alimento, indica que esse produto apresenta contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, condições higiênicas insatisfatórias (SOUSA, 2006).

Além do seu papel como microrganismo indicador, outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (FRANCO, 2002).

As *E. coli* envolvidas em doença intestinal são denominadas *E. coli* diarreio gênicas e são agrupadas em seis categorias com base em características de virulência e diferenças quanto à epidemiologia e composição antigênica O:H. Essas categorias (ou virotipos) são: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica/*E. coli* produtora de toxina Shiga (EHEC/STEC) e *E. coli* produtora de aderência difusa (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Diversas cepas de *E. coli* apresentam espécie-especificidade, não demonstrando importância na transmissão animal-homem. No entanto, durante a década de 80, uma preocupação com novas modalidades de enteropatogenicidade veio à tona, após o relato de um surto de doença gastrointestinal, colite hemorrágica (CH) e síndrome urêmica hemolítica (SHU) ocorrido nos Estados Unidos, quando um sorotipo (O157:H7), até então incomum, foi isolado. Tal surto foi associado à ingestão de hambúrguer bovino mal cozido. O fato desta bactéria, comum às fezes dos animais, ser detectada em alimentos, indicou um potencial zoonótico da amostra (RILEY et al., 1983). A capacidade de sobreviver ao baixo pH do estômago e a baixa dose infectante, em que são necessárias, apenas 100 células para a colonização do trato intestinal de humanos, permite que essas cepas de *E. coli* O157:H7 atuem como um patógeno importante de origem alimentar (RILEY et al., 1983; GORDEN; SMALL, 1993).

2.3 *E. coli* produtora de toxina Shiga

E. coli produtora de toxina Shiga faz parte de um grupo amplo de *E. coli* que elabora exotoxinas da família das toxinas Shiga (Stx). A produção de Stx por *E. coli* foi primeiramente descrita por KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC (1977), que a denominaram “verotoxina” (VT), por ser capaz de causar um efeito citotóxico irreversível em células Vero em cultura. O’BRIEN; LAVECK (1983) reconheceram em linhagens de *E. coli* a produção de uma toxina semelhante à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 denominando-a “Shiga like toxin” (SLT). Posteriormente, verificou-se que VT e SLT eram idênticas, e a inconveniência de uma dupla nomenclatura (VT/SLT) levou CALDERWOOD et al. (1996) a proporem uma nova denominação, reconhecendo essas toxinas como pertencentes à família das toxinas Shiga (Stx). Assim, as *E. coli* que carregam o gene *stx* ou elaboram Stx são referidas como STEC (“Shiga toxin-producing *E. coli*”) (JOHANNES; RÖMER, 2009).

Do ponto de vista médico, STEC estão associadas a um amplo espectro de manifestações como infecção inaparente, diarreia leve, CH e SHU (GRIFFIN, 1998; KEUSCH et al., 1998). Além da SHU, mais freqüente em crianças, STEC mostrou-se também associada à púrpura trombótica trombocitopênica (PTT), comum em adultos e caracterizada por hemólise, trombocitopenia, falência renal, problemas neurológicos e febre flutuante (KEUSCH et al., 1998).

No Brasil, casos esporádicos de diarreia e SHU associados à infecção por STEC foram relatadas (CANTARELLI et al., 2000; GUTH et al., 2002; IRINO et al., 2002; VAZ et al., 2004; NISHIMURA et al., 2005).

2.4 Virulência de STEC

A toxina Stx ainda é considerada como o principal fator de virulência nas STEC (PATON; PATON, 1998b; CAPRIOLI et al., 2005), sendo subdividida nos tipos 1 (Stx1) e 2 (Stx2) (MELTON-CELSA; O’BRIEN, 1998; CAPRIOLI et al., 2005). Stx1 inclui duas variantes (Stx1 e Stx1c), enquanto Stx2 apresenta múltiplas variantes (Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f), distintas na sequência de aminoácidos da subunidade B (BASTIAN; CARLE; GRIMONT, 1998; BRETT et al., 2003).

Além da toxina Shiga, STEC possui outros fatores de virulência e diferentes ilhas de patogenicidade (HACKER; KAPER, 2000) e, entre elas, destaca-se a chamada região LEE (“locus of enterocyte effacement”), a qual codifica para todos os elementos necessários para a adesão e destruição das microvilosidades intestinais, levando a um quadro histopatológico denominado lesão A/E (“attaching and effacing”) (NATARO; KAPER, 1998).

A lesão A/E, classificada primeiramente em cepas de EPEC, é caracterizada basicamente pela destruição das microvilosidades, aderência íntima entre a bactéria e a membrana da célula hospedeira com o acúmulo de filamentos de actina e, conseqüentemente, formação de uma estrutura semelhante a um pedestal sob a bactéria. Os genes bacterianos, como *eae* (adesina intimina) e *tir* (receptor de intimina, Tir), são alguns dos genes presentes na região LEE (NATARO; KAPER, 1998; FRANKEL, 1998). No entanto, diversos estudos já demonstraram formas alternativas de compensar a ausência do locus LEE, como a expressão de uma adesina autoaglutinante de STEC (Saa), codificada em um plasmídio de alto peso molecular e descrita em cepas de STEC O113:H21. (PATON et al., 2001). Essa adesina, aparentemente capaz de mediar a aderência bacteriana à células epiteliais *in vitro*, posteriormente mostrou-se mais relacionada a STEC LEE-negativas de origem bovina do que de origem humana (JENKINS et al., 2003), sugerindo a hipótese de que Saa poderia desempenhar um papel na colonização do intestino bovino por STEC, suprimindo a ausência da região LEE.

Cepas de STEC O157 e STEC não-O157 envolvidas em doença humana carregam um plasmídio de aproximadamente 60 MDa. Entre os presumíveis fatores de virulência codificados neste plasmídio, podem-se citar os genes responsáveis pela codificação da citotoxina denominada enterohemolisina, EHEC-hemolisina ou E-Hly, (*ehxA*) e uma serina-protease (*EspP*), proteína auto-transportadora codificada pelo gene *espP* que clivaria o fator V da coagulação humana (LEVINE et al., 1987, BURLAND et al., 1998, LEBLANC, 2003). Apesar de não se ter ainda comprovado o envolvimento de E-Hly na patogênese de STEC, sabe-se que pacientes com SHU desenvolvem anticorpos contra a hemolisina (SCHMIDT; KARCH, 1996). Cogita-se que a lise de eritrócitos *in vivo* possa contribuir para a multiplicação da bactéria, por aumentar a disponibilidade de ferro (NATARO; KAPER, 1998).

2.5 Fatores que afetam o desenvolvimento de *E. coli* em alimentos

O comportamento dos microrganismos nos alimentos é determinado pelas propriedades desses produtos (pH, atividade de água (Aa), dentre outros), como também, pelas condições de estocagem (temperatura, umidade relativa e atmosfera que envolve o alimento) (NAKASHIMA et al., 2000). O desenvolvimento de *E. coli* em alimentos é dependente da interação desses fatores intrínsecos e extrínsecos, além da competição com outros microrganismos (VARMAN; EVANS, 1996; BUCHANAN; DOYLE, 1997). Com ênfase na temperatura, o padrão de desenvolvimento de *E. coli* situa-se na faixa de 7 °C a 48°C com o ótimo em temperatura de 37°C. Porém, existem exceções que envolvem as cepas patogênicas (VARMAN; EVANS, 1996). Alguns trabalhos apontam que a temperatura mínima de crescimento para *E. coli* O157:H7 é aproximadamente 8-10°C (BUCHANAN; BAGI, 1994; RAJKNOWSKI; MARMER, 1995).

A concentração hidrogeniônica, que determina o pH dos alimentos, é um dos principais fatores que exercem influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição dos microrganismos, que nele se encontram presentes (SILVA, 2000). Referindo-se ao valor de pH, a “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF, 1980) descreve que *E. coli* é capaz de multiplicar-se bem na faixa compreendida entre 4,0 e 9,0. Para VARMAN; EVANS (1996), existem interações entre o pH e outros fatores incluindo temperatura, Aa e natureza do acidulante. O pH mínimo para o desenvolvimento de *E. coli* é 4,0-4,5 (BUCHANAN; BAGI, 1994), sendo esse dependente da interação com outros parâmetros de crescimento. A sobrevivência dos patógenos em alimentos ácidos tornou-se importante depois de relatos de surtos de *E. coli* O157:H7 em alimentos de baixo pH como maionese, cidra e sucos de maçã e laranja pasteurizados (ZHAO; DOYLE, 1994), sendo que em temperatura de refrigeração, a sobrevivência nesses alimentos é prolongada (BUCHANAN; DOYLE, 1997). A tolerância ácida está associada à expressão de genes que são regulados pelo fator Sigma - um importante regulador atuante no final da fase log e na fase estacionária de crescimento codificado pelo gene *rpoS* - muitos outros genes que codificam fatores protetores de condições adversas podem estar sendo simultaneamente expressos. O fator Sigma contribui para a proteção de *E. coli* em condições ambientais adversas como falta de nutrientes, hiperosmolaridade, dano oxidativo e radiação UV (SMALL et al., 1994).

E. coli apresenta condições ótimas de Aa 0,95 (VARMAN; EVANS, 1996; PRESSER; RATKOWSKY; ROSS, 1998). Embora a sobrevivência de *E. coli* seja inibida pela baixa Aa dos alimentos, muitos surtos de STEC O157:H7 em alimentos secos já foram descritos (HIRAMATSU et al., 2005).

Algumas cepas de STEC são altamente resistentes ao estresse físico-químico, assim como à acidez e ambientes secos, e podem sobreviver por longos períodos no solo, estrume e água (MAULE, 2000; LOUKIADIS et al., 2006). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas quando dessecada, mesmo sob temperatura de refrigeração (BAGI; BUCHANAN, 1993).

2.6 Transmissão de STEC

Animais domésticos e selvagens, principalmente ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos são considerados os principais reservatórios de STEC (BEAUTIN et al., 1993). A maioria dos animais colonizados por STEC são assintomáticos, mas algumas cepas de STEC podem estar associadas com diarreia em bezerros neonatos (NATARO; KAPER, 1998). Este grupo bacteriano possui, em geral, uma marcante capacidade de sobrevivência quando excretado nas fezes bovinas, fazendo com que seja importante fonte de reinfecção do gado e possível fonte de contaminação do ambiente (GUDONG; ZHAO; DOYLE, 1996). Adicionalmente, HUSSEM; SAKUMA (2005) relatam que o ambiente contaminado de fazendas leiteiras pode persistir como fonte de infecção de STEC por vários meses.

A ocorrência de STEC em bovinos tem sido amplamente relatada na literatura. Foram isoladas STEC em amostras fecais de bovinos e suínos no Chile (RIOS, 1999). Na Austrália, STEC foi isolada em 13% das amostras de fezes bovinas (ROBINS-BROWNE; ELLIOTT; DESMARCHELIER, 1998). Na França FREMAUX et al. (2006), pesquisando amostras de fezes, em fazendas leiteiras, encontraram o gene *stx* em 35% das fezes. LEOTTA et al. (2006) encontraram uma frequência para STEC de 50,8% em fezes de mamíferos selvagens de um zoológico e de um jardim botânico na Argentina, sendo que, nesse país, STEC está presente principalmente em gado de corte. Na África, 72% das amostras de fezes bovinas estudadas eram positivas para STEC (MAJALIJA et al., 2008).

No Brasil, YANO et al. (1986), estudando bezerros com diarreia na região Centro-Oeste, observaram que 70% das *E. coli* isoladas eram produtoras de Stx. CERQUEIRA et al. (1999) observaram que 71% das amostras fecais bovinas da região Metropolitana do Rio de

Janeiro abrigavam o gene *stx*. GONZALEZ (2003) identificaram cepas de STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio. Uma pesquisa realizada no Estado do Rio de Janeiro com 1221 amostras fecais de bovinos sadios demonstrou que 61% dos animais carregavam STEC (JOAQUIM, 2002). Já no estado de Minas Gerais, OLIVEIRA et al. (2007) observaram a presença de STEC em amostras fecais de búfalos, variando de zero a 64%, de acordo com o local. Em rebanhos do Paraná, PIGATTO et al. (2008) encontraram 36% de STEC em fezes de bovinos sadios de 33 diferentes sorotipos. Entre os genes encontrados, *stx1* estava presente em 10 % dos isolados, *stx2* em 43%, *stx1* e *stx2* em 47% e *eae* em 1%. No mesmo estado, FARAH et al. (2007) detectaram em 57% das fezes bovinas a presença de STEC.

Animais infectados por STEC podem ser incluídos na produção de alimentos. Como consequência, produtos de origem animal como carne, leite e derivados são fontes potenciais de contaminação por STEC (HUSSEIN; SAKUMA, 2005). A primeira descrição do isolamento de STEC associado à doença a partir de alimentos foi feita por RILEY et al. (1983) que isolaram um sorotipo até então raro de *E. coli* (sorotipo O157:H7) de um surto de doença gastrointestinal, caracterizada por dores abdominais severas, diarreia aquosa seguida por um quadro de diarreia sanguinolenta e pouca ou nenhuma febre. Esse surto foi associado à ingestão de hambúrguer mal-cozido de uma cadeia de “fast-food” nos Estados Unidos. Outras preparações de carne bovina (GRIFFIN, 1998), além de carnes de frangos e de ovinos (DOYLE; PADHYE, 1989) podem veicular STEC. Bactérias *stx*-positivas têm sido isoladas de porcos e alguns produtos suínos envolvidos em infecções humanas (Gobius; Desmarchelier, 2000; Bouvet et al., 2001) e, portanto, suínos podem ser um veículo de contaminação deste patógeno.

Ainda que a carne seja o alimento mais associado a contaminação, produtos derivados de animais como o leite e derivados já foram relatados como fonte de infecção. Outros alimentos sujeitos à contaminação por fezes bovinas também são um risco, como frutas e vegetais crus, maionese, suco de maçã não pasteurizado e salame (PATON; PATON, 1998). Além disso, fontes como água de consumo humano, água de piscina e o contato com animais contaminados também devem ser considerados (GYLES, 2006). É importante destacar que o processo de corte da carne pode ser responsável pela contaminação cruzada de outros alimentos com STEC (GRIFFIN, 1998). Essa contaminação é facilitada pelo contato das vísceras com a carne e superfície dos equipamentos (CDC, 2000). O contato entre pessoas é outro importante modo de transmissão pela rota fecal-oral, inclusive através de portadores

assintomáticos (GYLES, 2006). A maioria dos estudos sobre a ocorrência de STEC em alimentos relaciona-se com surtos alimentares.

Há poucos dados sobre a ocorrência de STEC em alimentos no Brasil. No Rio de Janeiro, 20% das amostras de carne moída crua apresentavam STEC (CERQUEIRA; TIBANA; GUTH, 1997) e, em São Paulo, 3,5% das amostras (BERGAMINI et al., 2007). GONZALEZ et al. (2000) detectaram STEC em carcaças de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Contudo, neste mesmo estudo, não isolaram STEC nas amostras de queijo Minas Frescal examinadas. No Paraná, TIMM et al. (2009) não detectaram STEC das 464 cepas de *E. coli* isoladas nas amostras de carne moída e leite cru.

2.7 Contaminação de STEC em leite e derivados

O leite é um alimento consumido extensivamente pela população brasileira, sendo essencial na dieta de adultos e crianças e considerado o mais completo alimento natural. O Brasil ocupa a sexta posição entre os maiores produtores de leite do mundo (PINTO, 2009). Admite-se que, a despeito do impedimento legal, parte significativa do leite cru chegaria a consumidores e seria empregado na fabricação de produtos lácteos, oferecendo riscos de transmissão de patógenos e zoonoses. Portanto, existe uma grande possibilidade de que o leite não processado possa veicular agentes infecciosos, inclusive STEC. Além disso, devido à sua composição química, o leite é um produto com grande facilidade de contaminação por microrganismos (DOYLE et al., 1997; CHYE et al., 2004). Em estudo sobre leite cru produzido por pequenos produtores de cinco estados brasileiros, NERO et al. (2004) encontraram *E. coli* em 36,8% das amostras investigadas. Embora os autores não definam a origem do microrganismo, é razoável admitir que provenham majoritariamente do intestino bovino, onde a colonização por STEC é muito frequente. Outros investigadores relatam o isolamento de STEC do rebanho leiteiro nacional ou mesmo do leite (CERQUEIRA et al., 1999; MOREIRA et al., 2003; LIRA; MACEDO; MARIN, 2004; IRINO et al., 2005). É importante considerar o risco de contaminação do leite por microrganismos patogênicos durante a ordenha. Essa contaminação é influenciada por fatores como as condições climáticas da região, a higiene do manipulador, o ambiente, os utensílios e equipamentos utilizados no processo (GUERREIRO et al., 2005).

O Guia Alimentar para a População Brasileira, formulado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), preconiza o consumo de três porções diárias de leite e derivados por dia, por

serem fontes de proteínas, vitaminas e cálcio, sendo este último nutriente, importante para a formação e manutenção da massa óssea. O consumo global de leite e de outras bebidas derivadas chegou a um pico de 258 bilhões de litros em 2008, de acordo com nova pesquisa da Tetra Pak. Apesar da crise econômica global, a previsão é que o consumo mundial de laticínios continue a crescer a uma taxa anual composta de 2,2% até 2012 (TETRA PAK, 2009).

Produtos lácteos são alimentos que possuem o leite como a principal matéria prima em sua composição (FURTADO, 1990). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define queijo da seguinte forma:

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996, p. 43).

O queijo Minas frescal é o terceiro queijo mais produzido no Brasil (PFLANZER JR et al., 2006). É classificado como queijo macio e caracteriza-se pela alta atividade de água (0,99), pH em torno de 6,8 e 1 a 6% de Cloreto de Sódio (NaCl) (FREITAS et al., 1993, WALSTRA et al., 2001, CARVALHO, 2003, TRONCO, 2003). Possui cerca de 43 a 55% de umidade, devendo ser consumido nos primeiros 15 dias após sua fabricação sendo, portanto, um produto altamente perecível (HOFFMAN; SILVA; VINTURIM, 2002; CAMPOS, 2006). No entanto alguns autores apontam, ainda, uma vida de prateleira acima de 15 dias (SANGALETTI, 2007). O QMF deverá manter-se a uma temperatura não superior a 8°C (SILVA JÚNIOR, 2002). Apesar da legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo do QMF, é frequente a comercialização de um produto que não atenda a essa especificação legal (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001). Análises de QMF no varejo têm revelado importantes problemas de higiene na maioria das amostras analisadas (ARAÚJO et al., 2001a,b, ARAÚJO et al., 2002; GONZALEZ et al., 2000; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007).

Com o nome de queijo prato se entende o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1996, p. 43). Segundo FURTADO, LOURENÇO, 1994; VALE et al., 1992, o queijo prato, em média, é

composto por: umidade (42-44%), gordura (26-29%), sal (1,6-1,9%), proteína (23-25%) e seu pH encontra-se no intervalo de (5,2 – 5,4). A sua atividade de água se situa entre 0,94 a 0,96 (LEWIS, 1993).

O MAPA define leites fermentados como se segue:

“Entende-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos” (BRASIL, 2000, p.15).

O iogurte é um tipo de leite fermentado que constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos. O consumo deste produto está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, associado a suas propriedades sensoriais (TEIXEIRA et al., 2000). Nas últimas duas décadas houve um crescimento em sua produção no Brasil de maneira satisfatória, registrando atualmente uma produção média de 400 mil toneladas por ano, o que representa 76% do total de produtos lácteos (BOLINI, 2004). A sua característica físico-química inclui lactose (2,2%), proteína (3,5%), gordura (3,0%), cinzas (0,5%), pH (5,0%) e Aa (0,97%) (TAMINE, ROBSON, 1991).

O soro de queijo é o líquido residual a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005a). É considerado um subproduto da indústria de laticínios de grande importância, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional (SQUILASSI, 2004). Possui excelentes nutrientes como proteínas de alto valor biológico, vitaminas do grupo B e elevado teor de lactose e sais (NEVES, 1993; MAWSON, 1994).

A Tabela 1 mostra a composição dos principais produtos lácteos.

Tabela 1. Composição dos principais produtos lácteos

Alimento	pH	Aa	% lactose	% proteína	% gordura	% cinzas
Leite de vaca	6,8 ^a	0,99 ^b	4,9 ^a	3,9 ^a	3,9 ^a	0,7 ^c
QMF	6,4 ^d	≥ 0,98 ^m	4,3 ^e	12 a 18 ^f	20,5-29,2 ^g	3,6-4,3 ^h
Queijo prato	5,2-5,4 ⁱ	0,94-0,96 ^m	1,8 ^j	25,5 ^j	29 ^j	3,5 ^j
Iogurte	5 ^l	0,97 ^l	2,2 ^l	3,5 ^l	3,0 ^l	0,5 ^l
Soro de queijos ^k	6,5	0,92	5	0,91	0,36	0,52

pH: potencial de hidrogênio; Aa: atividade de água, QMF: queijo minas frescal.

Nota: ^a TRONCO, 2003; ^b WALSTRA et al., 2001; ^c MODLER, 2000; ^d CARVALHO, 2003; ^e ANDREATTA, 2006; ^f MACHADO et al., 2004; MARQUES, OLIVEIRA, 2004; ^g ROSA, 2004; ^h ANDREATTA et al., 2009; ⁱ FURTADO, LOURENÇO, 1994 ^j HOHENDORFF, SANTOS, 2006 ^k MODLER, 2000; OLIVEIRA, 1986; ^l TAMINE, ROBSON, 1991 ^mLEWIS, 1993.

O principal meio de transmissão de STEC no leite é pelas fezes durante a ordenha (CHIUEH et al., 2002). PADHYE; DOYLE (1991) detectaram *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru e queijo. Isolados de STEC também foram encontrados nesses produtos no Canadá, Bélgica, Alemanha, Reino Unido e nos Estados Unidos (WHO, 1998).

A *E. coli* é considerado um dos principais agentes de mastite bovina de origem ambiental, proveniente das fezes do animal (RADOSTITS et al., 2000). Esta enfermidade é um fator contribuinte para a queda da produção e da qualidade de leite e derivados. Em um estudo, foram isoladas STEC em 12% das amostras de leites de bovinos com mastite (LIRA; MACEDO; MARINS, 2004). Além disso, a presença de STEC no ambiente pode gerar uma elevada contaminação de produtos lácteos como queijos frescos produzidos com leite não pasteurizado (GERMANO; GERMANO, 1995; OMBUI et al., 1994).

A contaminação por STEC em iogurte foi relatada no Reino Unido envolvendo dezesseis pessoas, das quais cinco apresentaram SHU (MORGAN et al., 1993). Nesse mesmo país, amostras de queijos também foram contaminadas por STEC (CDSC, 1998; REID, 2001). É importante considerar que GOVARIS et al. (2002), em seu estudo, sugerem que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em produtos lácteos, e que medidas de controle na fabricação destes produtos são essenciais para diminuir o risco de contaminação.

Existe uma falta de padronização na produção de produtos lácteos devido, principalmente, à deficiência em fiscalização nas indústrias brasileiras. Portanto, os cuidados higiênicos sanitário devem começar desde a ordenha até a distribuição dos produtos (ROCHA et al., 2006). Dentre eles destacam-se os cuidados com o úbere, os hábitos higiênicos do ordenhador, do ambiente, além de cuidados com o armazenamento do leite coletado, devendo estar sob refrigeração no local de ordenha (TRONCO, 2003).

2.8 STEC do sorotipo O113:H21

Com base na presença da região LEE, pode-se determinar dois grupos para as STEC: cepas LEE-positivas – com destaque para os sorotipos O157:H7 e O111:H8 – e cepas LEE-negativas, cujo sorotipo mais comumente associado à doença humana é O113:H21. Cepas do sorotipo O113:H21 destacam-se pela ocorrência em casos esporádicos e em alguns surtos de diarreia, CH e SHU (PATON; PATON, 1998b; GOLDWATER; GILES; BETTELHEIM, 1998; PATON; PATON, 1999; BRETT et al., 2003). Esse sorotipo foi relatado em surtos como o ocorrido em Adelaide, no sul da Austrália (KARMALI, 1989; PATON; PATON,

1998; PATON; PATON, 1999). STEC LEE-negativas não produzem a lesão A/E, sendo aparentemente menos virulentas; entretanto, diversos casos esporádicos de diarreia, SHU e CH já foram descritos (KESKIMÄKI et al., 1997; BONNET et al., 1998; PATON; PATON, 1998a; BOERLIN et al., 1999).

Apesar de não possuírem o locus LEE, que confere uma aderência íntima da bactéria, cepas de STEC O113:H21 são capazes de aderir ao epitélio intestinal, mas sem recrutamento detectável de elementos do citoesqueleto, observado em cepas LEE-positivas como EPEC e EHEC O157 (DYTOC, 1994). Além disso, já foi observado que STEC O113:H21 é capaz de invadir células humanas como Caco-2 e HCT-8, sugerindo que cepas LEE-negativas podem empregar mecanismos de invasão para colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro (LUCK, 2005).

É notada a ausência de relatos de doenças em humanos no Brasil por STEC O113:H21, porém, esse sorotipo é encontrado com grande frequência em reservatórios animais no país (GUIMARÃES, 2009), o que foi constatado por alguns estudos (GONZALEZ, 2003; IRINO 2005; ZANGALI, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), pertencentes ao sorotipo O113:H21, isoladas de alimento (carne bovina), fezes humana e bovina, frente aos quatro fatores intimamente relacionados ao desenvolvimento de microrganismos em alimentos (pH, temperatura, tempo e Aa) em condições que simulam produtos lácteos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito individual e combinado de quatro fatores (pH, temperatura, tempo e Aa) sobre o comportamento de STEC O113:H21 em meio preparado com soro de queijo Minas Frescal (QMF).
- ✓ Comparar o comportamento de STEC O113:H21 frente aos fatores pH, temperatura, tempo e Aa em meio preparado com soro de QMF com o comportamento de *E. coli* da microbiota intestinal e *E. coli* DH5 α , isentas de fatores de virulência, sob as mesmas condições.
- ✓ Confrontar as condições estabelecidas neste estudo com as descritas na literatura de alguns produtos lácteos, a fim de avaliar o potencial desses alimentos como veículo de STEC O113:H21.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas utilizadas

Foram utilizadas as cepas de STEC O113:H21 potencialmente patogênicas (Tabela 2), EC 784 isolada de carne bovina, Rio de Janeiro (Cerqueira, 2000), 1108/1 de fezes humana (Buenos Aires, Argentina), gentilmente cedida pela Dra. Marta Rivas, “Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud” e RJ 702/1 isolada de fezes bovina, Rio de Janeiro (Gonzalez, 2003). A cepa coliforme termotolerante, isolada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFF, a partir de QMF, e a cepa laboratorial DH5 α (BLATTNER et al., 1997) foram incluídas na pesquisa com a finalidade de se comparar o comportamento destas cepas não patogênicas com as anteriormente citadas.

Tabela 2. Características fenotípicas e genotípicas das cepas estudadas (EC 784,1108/1 e RJ 702/1)

cepa	origem	genes cromossômicos			genes plasmidiais			fenótipo					
		PCR			PCR			Aderência					
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>iha</i>	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>espP</i>	<i>saa</i>	HEp-2	Caco-2	EHEC- Hly	Stx	FS	BG
EC 784	alimento	-	<i>stx2/stx2c</i>	-	+	+	+	-	AP	+	+	+	+
1108/1	humana	-	<i>stx2</i>	-	+	+	+	-	AP	+	+	+	+
RJ 702/1	bovina	+	-	+	+	+	+	-	AP	+	+	+	+

genes cromossômicos: *stx1*, *stx2*, toxinas Shiga; *iha*, adesão

genes plasmidiais: EHEC-*hlyA*, enterohemolisina; *espP*, serina protease extracelular; *saa*, adesão

fenótipos: HEp-2, linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano; Caco-2, linhagem de células de adenocarcinoma humano; AP, aderência periférica; EHEC-Hly, produção de enterohemolisina em agar-sangue lavado de carneiro; Stx, efeito citotóxico em células Vero (rim de macaco verde africano); FS, fermentação do sorbitol; BG, produção de β -D-glucuronidase

4.2 Procedimentos

4.2.1. Avaliação das variáveis pH, tempo, temperatura e Aa sobre o comportamento de *E. coli* em soro de QMF

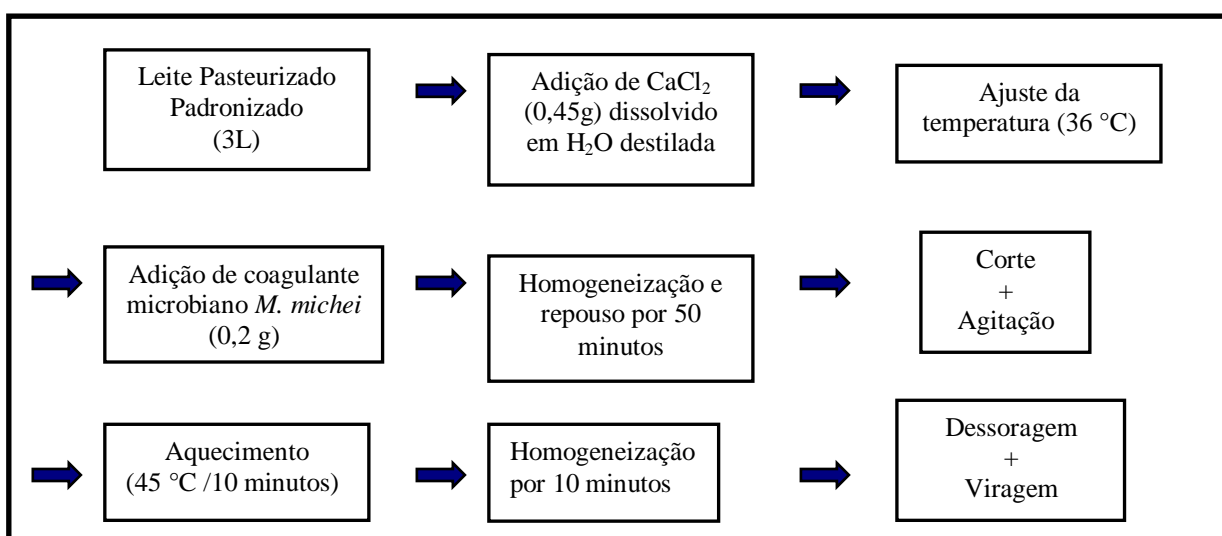
Meio à base de soro de QMF

Utilizou-se como meio soro de QMF preparado no Laboratório de Bromatologia da UFF, já que sua composição se assemelha ao do leite e de produtos lácteos, como queijos e iogurtes (OLIVEIRA, 1986; MODLER, 2000; WALSTRA et al., 2001; CARVALHO, 2003; SILVEIRA; ABREU, 2003; TRONCO, 2003; MACHADO et al., 2004; MARQUES; OLIVEIRA, 2004; ROSA, 2004; ANDREATTA, 2006; HOHENDORFF; SANTOS, 2006; MODLER, 2000; NDC, 2008; ANDREATTA et al., 2009).

Todo o leite pasteurizado padronizado utilizado como matéria-prima foi submetido à pesquisa de resíduos de beta lactâmicos (Kit Charm MRLBL; Charm Science, Lawrence, MA, EUA), além de cloro e hipocloritos segundo metodologia aplicada por TRONCO (2002), a fim de descartar a matéria-prima com potencial efeito de inibição do crescimento microbiano. Os resultados foram negativos para todos os testes.

A metodologia utilizada para elaboração do QMF com posterior dessoragem foi realizada de acordo com FURTADO, 1990 (**Figura 1**).

Figura 1. Fluxograma da produção de QMF e dessoragem



Fonte: FURTADO, 1990.

O soro de QMF foi clarificado em papel de filtro e algodão, centrifugado a 17203 g/10 minutos em centrífuga Eppendorf[®] modelo nº 5403, diluído (2% de lactose) e filtrado em membrana com poros de 0,22 µm (Millipore[®]). O pH foi ajustado com solução 1 mol/L de HCl ou NaOH e conferido pelo peagômetro de marca Handylab1[®] (Schott). A Aa do meio foi ajustada pela adição de NaCl, até atingir o valor desejado, sendo tais valores aferidos pelo aparelho Pawkit[®] (Decagon, Pullman, WA, USA). Os valores de pH e Aa estão inseridos na **Tabela 3**.

4.2.2 Padronização do inóculo

O inóculo bacteriano foi efetuado a partir de uma cultura estoque, mantida a -20°C, em meio TSB (Trypticase Soy Broth; Himedia) adicionado de glicerol a 20%, do qual foi retirado aproximadamente 10 µl com uma alça bacteriológica, transferida para um tubo contendo 5 mL de meio TSB e incubado por 20 h em estufa a 35°C. Uma alíquota de 200 µL da cultura em meio TSB foi transferida para um tubo contendo 3 mL de salina tampão fosfato 0,01M segundo Dulbeco (PBS-D - NaCl 8,0g, KCl 0,2g, Na₂HPO₄ 0,2g, H₂O q.s.p. 1000mL, pH 7,2). A densidade óptica (D.O.) foi medida em comprimento de onda de 600 nm com o uso do espectrofotômetro SPEC 20 MV[®]. A D.O. foi ajustada para 0,10 utilizando PBS-D ou cultivo em TSB. Este ajuste nos forneceu um cultivo bacteriano de aproximadamente 10⁷ células/mL de PBS-D segundo curva de calibração obtida anteriormente. Uma alíquota de 300 µL deste inóculo padronizado foi inoculada em 10 mL de meio à base de soro de QMF nas condições próprias para cada teste. Essa diluição padronizou o número de células inoculadas em meio a base de soro de QMF em 3 X 10⁵ células/mL, o que possibilitou comparar as diferentes características de comportamento bacteriano nas diferentes condições as quais o meio foi submetido (**Figura 2**).

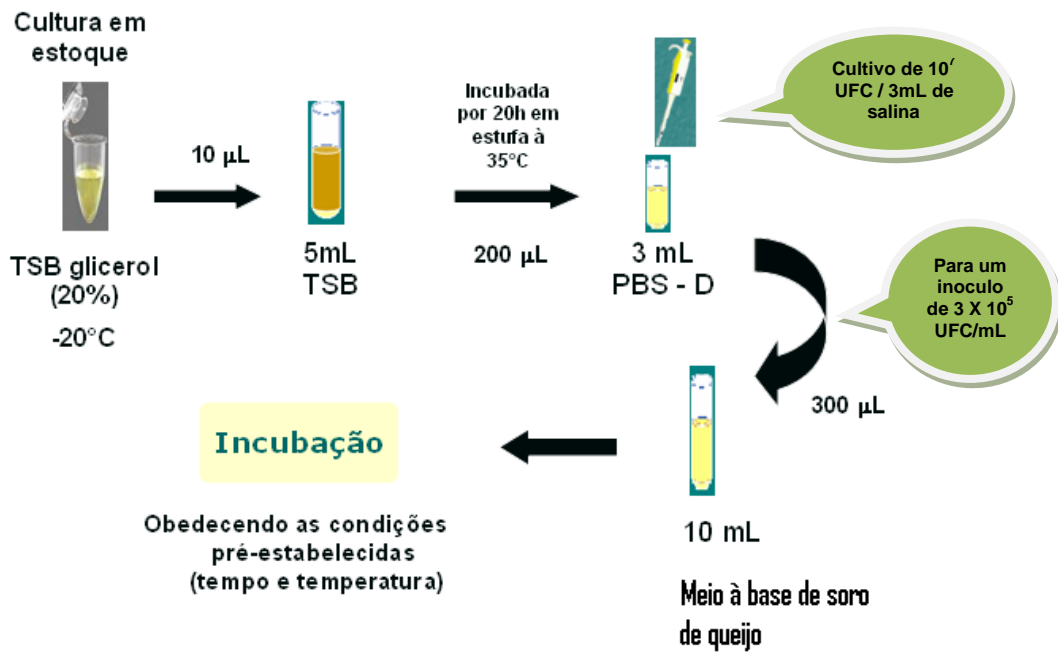


Figura 2. Etapas de padronização do inóculo e inóculo em meio de QMF

Fonte: ALMEIDA, M.V.M. Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 frente a pH, atividade de água, tempo e temperatura. *Monografia de conclusão de curso* – IMPPG. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

4.2.3 Desenho experimental

Foram incluídas no desenho experimental as variáveis independentes (k fatores), pH, temperatura, tempo e atividade de água (Aa), em três diferentes níveis. Os níveis de cada variável estão descritos na Tabela 3 e foram escolhidos a fim de simular as diferentes características intrínsecas dos produtos lácteos, assim como suas condições de armazenamentos em temperaturas de 8°C, condição mínima de conservação e comercialização (SILVA JÚNIOR, 2002), 26°C que é considerada temperatura ambiente, e 35°C, temperatura usual na estação do verão no qual muitos produtos são expostos, insatisfatoriamente, para comercialização; nos tempos de 0, representando o inóculo de contaminação inicial, 7 e 15 dias, simulando a faixa do prazo de validade destes produtos (HOFFMAN; SILVA; VINTURIM, 2002; COELHO et al., 2009) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Modelo para a construção da matriz de experimentos fatorial fracional (3^{4-1}) utilizado para avaliar o comportamento das cepas bacterianas em estudo sob o efeito de quatro fatores em três diferentes níveis.

Fatores	Níveis		
	mínimo	médio	máximo
pH	5,0	6,0	7,0
Aa	0,92	0,94	0,96
Tempo	0	7	15
Temperatura	8	26	35

Nota. pH: potencial de hidrogênio livre; Aa: atividade de água, t: tempo em dias
T: temperatura em graus Celsius;

A determinação das condições testadas para avaliar o efeito das quatro variáveis sobre a resposta (contagem de UFC) foi realizada por um planejamento experimental fatorial fracional (3^{k-1}), utilizando-se três níveis de cada uma das quatro variáveis independentes (3^{4-1}). Este planejamento permite um número bem menor de ensaios laboratoriais, correspondente a fração do número de ensaios do planejamento fatorial completo (3^4) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). O planejamento foi gerado pelo software Statistica 7 (StatSoft, OK, USA). O desenho experimental determinou um número de 27 testes diferentes, com duas repetições autênticas do experimento, somando

81 corridas. As repetições são efetuadas, a fim de melhorar a precisão do experimento. A Tabela 4 descreve as condições dos testes realizados.

Tabela 4. Desenho experimental fatorial fracional (3^{4-1}) utilizado para avaliar o comportamento das cepas bacterianas em estudo sob o efeito de quatro fatores em três diferentes níveis.

Nº do teste	pH	T (°C)	t (dias)	Aa
1	5,0	8	0	0,92
2	5,0	8	7	0,96
3	5,0	8	15	0,94
4	5,0	26	0	0,96
5	5,0	26	7	0,94
6	5,0	26	15	0,92
7	5,0	35	0	0,94
8	5,0	35	7	0,92
9	5,0	35	15	0,96
10	5,0	8	0	0,96
11	6,0	8	7	0,94
12	6,0	8	15	0,92
13	6,0	26	0	0,94
14	6,0	26	7	0,92
15	6,0	26	15	0,96
16	6,0	35	0	0,92
17	6,0	35	7	0,96
18	6,0	35	15	0,94
19	7,0	8	0	0,94
20	7,0	8	7	0,92
21	7,0	8	15	0,96
22	7,0	26	0	0,92
23	7,0	26	7	0,96
24	7,0	26	15	0,94
25	7,0	35	0	0,96
26	7,0	35	7	0,94
27	7,0	35	15	0,92

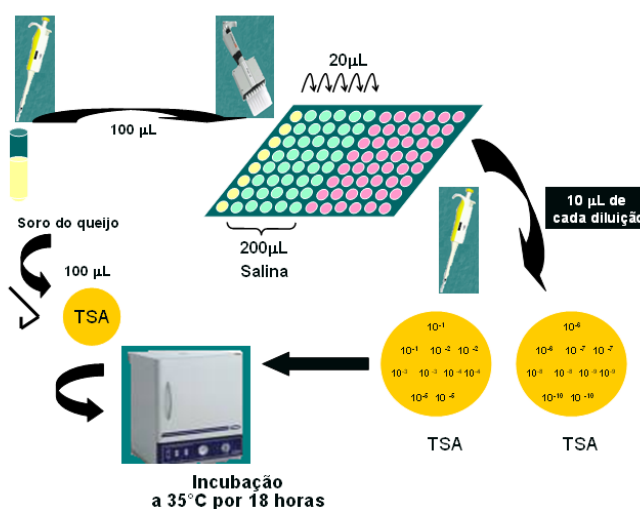
Nota. pH: potencial de hidrogênio livre; T: temperatura em graus Celsius; t: tempo em dias; Aa: atividade de água.

O tratamento estatístico adequado permitiu investigar os efeitos isolados e combinados das variáveis em estudo, a partir de modelos de regressão linear múltiplos, efetuados pelo programa *Statistica 7*.

4.2.4 Contagem de células viáveis

Nos tempos estipulados para as análises, foram realizadas as contagens de células viáveis para a avaliação do comportamento da cepa em função do inóculo inicial. Na primeira coluna de uma microplaca de 96 orifícios, foram acrescentados 200 μl de meio de QMF previamente inoculado (diluição 10^0), um poço para cada amostra. Foram transferidos 20 μl do primeiro poço para os poços seguintes que continham 200 μl de PBS-D cada, homogeneizado e repetido o processo até o último poço, a fim de se realizar as diluições subseqüentes (até 10^{-5}). Uma alíquota de 100 μl do material não diluído (10^0) foi semeada em uma placa de TSA (Trypticase Soy Agar; Biomerieux) e 10 μl das demais diluições foram semeadas em *spot* em outra placa de TSA, sendo todas as diluições semeadas em duplicata e incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 h. Após incubação, foi realizada a contagem de células viáveis, expressas em UFC/mL (**Figura 3**).

Figura 3. Figura esquemática das diluições e inoculações para a contagem de células viáveis



Fonte: ALMEIDA, M.V.M. Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 frente a pH, atividade de água, tempo e temperatura. *Monografia de conclusão de curso* – IMPPG. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

4.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo planejamento experimental “central composite design” (Statistica 7). Em estatística, “central composite design” é um modelo experimental, utilizado na metodologia da superfície de resposta. A superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos experimentais, utilizada na modelagem de diversos processos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

A partir de um modelo de regressão linear múltiplo foram gerados gráficos de superfícies de resposta. O modelo de regressão múltiplo é o método estatístico que utiliza a relação entre duas ou mais variáveis de modo que uma variável pode ser estimada (ou predita) a partir da outra ou das outras variáveis (CHATTERJEE; BERTRAM, 1991).

Com o objetivo de visualizar os efeitos de cada variável independente sobre a resposta, o “central composite design” é capaz de construir, a partir dos resultados obtidos (contagem de UFC), um gráfico de Pareto que identifica os efeitos significativos. Este Gráfico é cortado por uma linha tracejada vermelha, que indica o limite mínimo de significância das variáveis ($p=0,05$). As variáveis independentes, assim como suas interações, que apresentaram efeito significativo sobre a resposta foram utilizadas na construção de uma equação gerada a partir do modelo de regressão linear múltiplo. A partir desta equação pode-se prever o comportamento das cepas bacterianas estudadas, dentro dos intervalos das condições avaliadas, no meio de soro de QMF. As superfícies de resposta geradas ilustram a equação obtida.

As variáveis independentes usadas no modelo estão relacionadas com a variabilidade total da variável resposta (variável dependente). Nos modelos de regressão linear múltiplos a estatística usada para quantificar a capacidade explicativa do modelo é o R^2 , designado por coeficiente de determinação. Esse cálculo estatístico constitui a proporção da variação explicada (variável independente) face à variação total da variável dependente. O coeficiente de determinação varia de 0 a 1. Assim, R^2 igual a 0,75 significa que 75% de variância é explicada pelo modelo. Alguns autores recomendam o uso do coeficiente de determinação "ajustado", que leva em conta o número de variáveis explicatórias em relação ao número de observações. Neste estudo os modelos de regressão que apresentaram R^2 ajustado entre 0,7 a 1 foram avaliados, segundo as recomendações de SHEEN; HWANG (2009).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos, a partir da contagem do número de células viáveis das cepas bacterianas em estudo, foram analisados pelo modelo experimental “central composite design”, o qual foi capaz de construir as equações que modelam o comportamento bacteriano a partir de um modelo de regressão linear múltiplo.

5.1 Cepa EC 784 (carne bovina)

Ao analisar o resultado obtido a partir dos ensaios experimentais com a cepa EC 784, pôde-se observar que nenhum teste resultou no aumento da população bacteriana em relação ao inóculo inicial (3×10^5 células/mL de meio de soro de QMF). A condição mais favorável foi apresentada no teste 24 (pH 7, Aa 0,94 a 26°C por 15 dias). Na condição de pH 5, Aa de 0,96 a 35°C por 15 dias (teste 9) não foi possível recuperar nenhuma célula viável (**Tabela 5**).

Tabela 5. Contagem de células viáveis (UFC/mL) de STEC EC 784 a partir dos 27 experimentos em meio de soro de QMF de acordo com a Tabela 4.

Teste	Células viáveis UFC/mL ^a		
	A	B ^b	C ^b
1	3 X 10 ^{5c}	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
2	8,9 x 10 ³	8,5 x 10 ³	9,4 x 10 ³
3	8,5 x 10 ³	9,0 x 10 ³	6,0 x 10 ³
4	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
5	4,5 x 10 ³	1,8 x 10 ³	4,0 x 10 ³
6	1,9 x 10 ²	1,7 x 10 ²	1,9 x 10 ²
7	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
8	1	4	3
9	0	0	0
10	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
11	2,9 x 10 ³	3,6 x 10 ³	1,1 x 10 ³
12	8,0 x 10 ²	8,5 x 10 ²	7,8 x 10 ²
13	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
14	2,6 x 10 ³	1,2 x 10 ³	8,7 x 10 ³
15	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²
16	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
17	1,7 x 10 ³	7,5 x 10 ²	5,0 x 10 ²
18	1,0 x 10 ²	4,6 x 10 ²	1,8 x 10 ²
19	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
20	4,7 x 10 ²	5,0 x 10 ²	4,5 x 10 ²
21	1,6 x 10 ³	2,2 x 10 ³	2,8 x 10 ³
22	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
23	9,3 x 10 ²	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
24	9,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴
25	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
26	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
27	8,9 x 10 ³	8,9 x 10 ³	7,8 x 10 ³

a: UFC: unidade formadora de colônia por ml de soro de QMF. b: Repetições. c: Inóculo inicial

Todas as variáveis apresentaram efeito, individual ou combinado, significativo sobre o comportamento da cepa EC 784 (variável dependente), sendo o efeito linear (L) da variável tempo o mais relevante. Esta variável apresentou efeito individual negativo (-1087), ou seja, com o aumento do tempo, ocorreu a diminuição da população de STEC EC 784 (**Figura 4, 7, 8 e 9**).

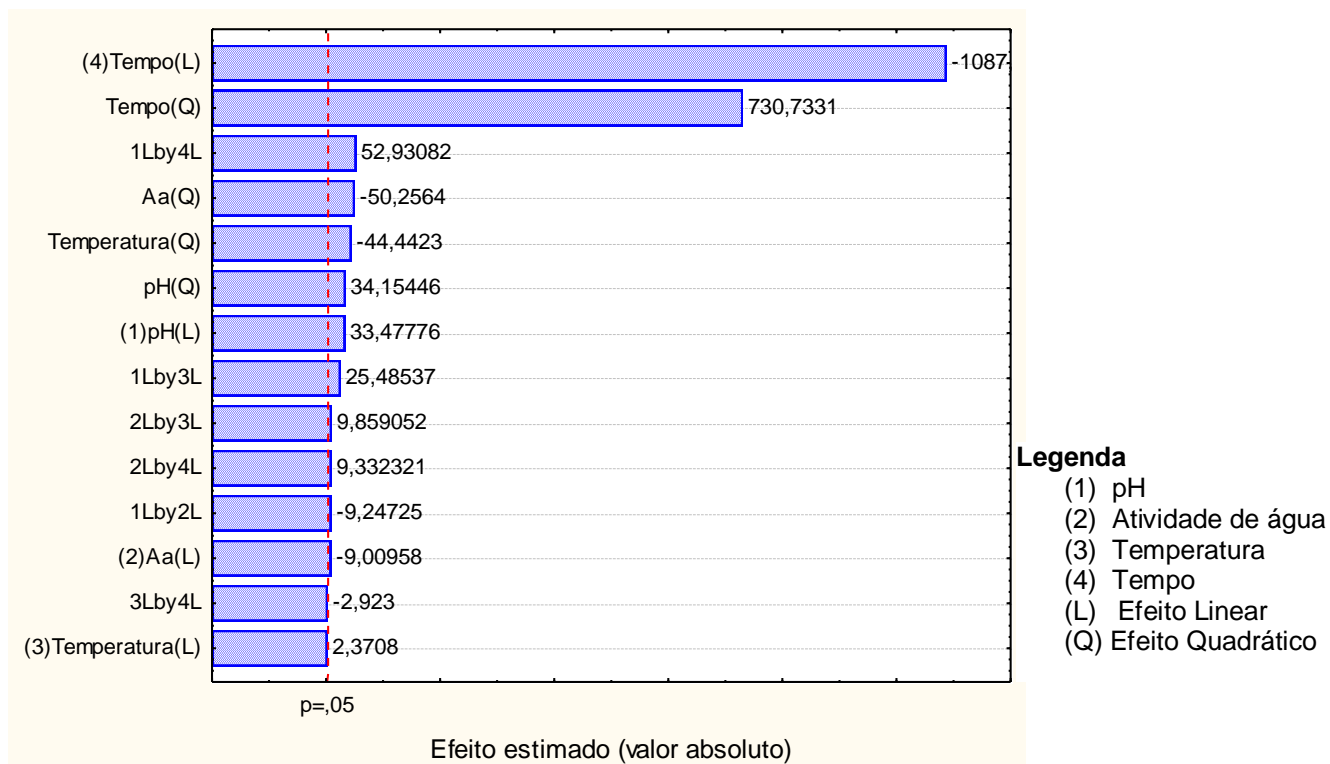


Figura 4. Gráfico de Pareto representando os efeitos individuais e combinados dos quatro fatores estudados (pH, Aa, tempo e temperatura) sobre o comportamento da cepa EC 784.

As outras variáveis independentes ou combinadas, apesar de apresentarem baixo efeito significativo, também foram utilizadas para a confecção da equação que modela o comportamento bacteriano (**Figura 5**), com valor de R^2 ajustado igual a 0,99, isto é, o modelo de regressão escolhido apresenta 99% de adequação. O gráfico das respostas previstas contra as respostas observadas confirma visualmente a qualidade do modelo (**Figura 6**).

$$EC\ 784 = 2107 + (8481 \cdot pH) + (16345 \cdot pH^2) - (2364 \cdot Aa) - (22272 \cdot Aa^2) + (612 \cdot T) - (22498 \cdot T^2) - (285715 \cdot t) + (325745 \cdot t^2) - (2926 \cdot pH \cdot Aa) + (7890 \cdot pH \cdot T) + (16752 \cdot pH \cdot t) + (3200 \cdot Aa \cdot T) + (3066 \cdot Aa \cdot t) - (947 \cdot T \cdot t)$$

Figura 5. Equação que modela o comportamento da cepa STEC EC 784, gerada a partir do modelo de regressão linear múltiplo estabelecido.

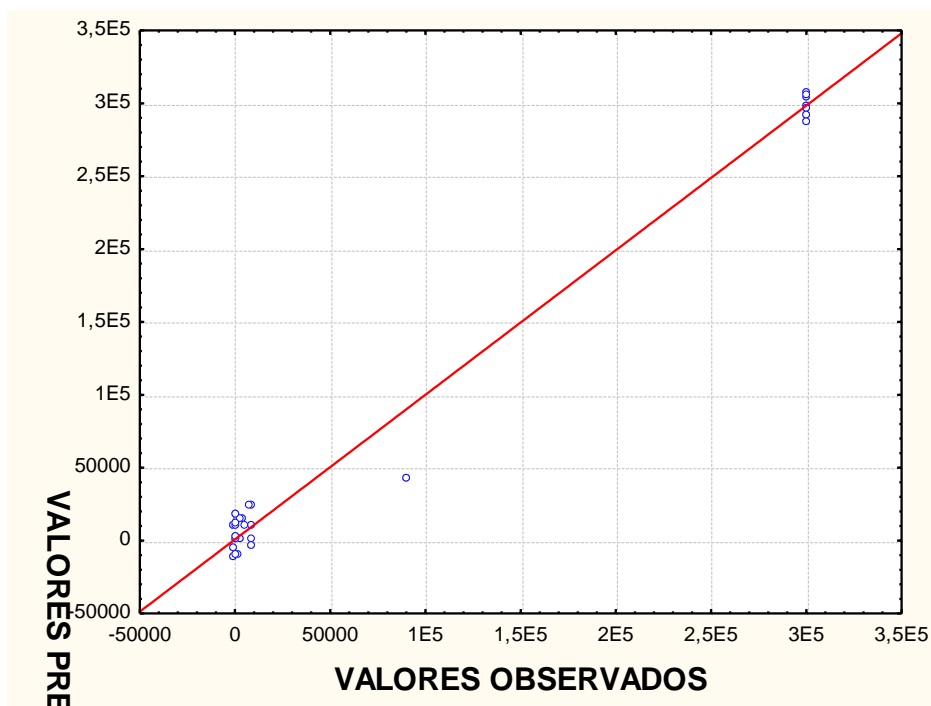


Figura 6. Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa EC 784.

Os gráficos de superfície gerados a partir da análise de todos os efeitos significativos sobre a resposta ilustram o comportamento da cepa EC 784, onde pôde ser observada a redução bacteriana com o aumento do tempo. Sob as condições de pH 7 e temperatura de 26°C, o efeito da variável Aa sobre o comportamento de EC 784, apresentou-se semelhante nos diferentes níveis (**Figura 7**). O mesmo pôde ser observado variando-se a temperatura (**Figura 8**) e variando-se o pH (**Figura 9**) em condições de Aa de 0,94.

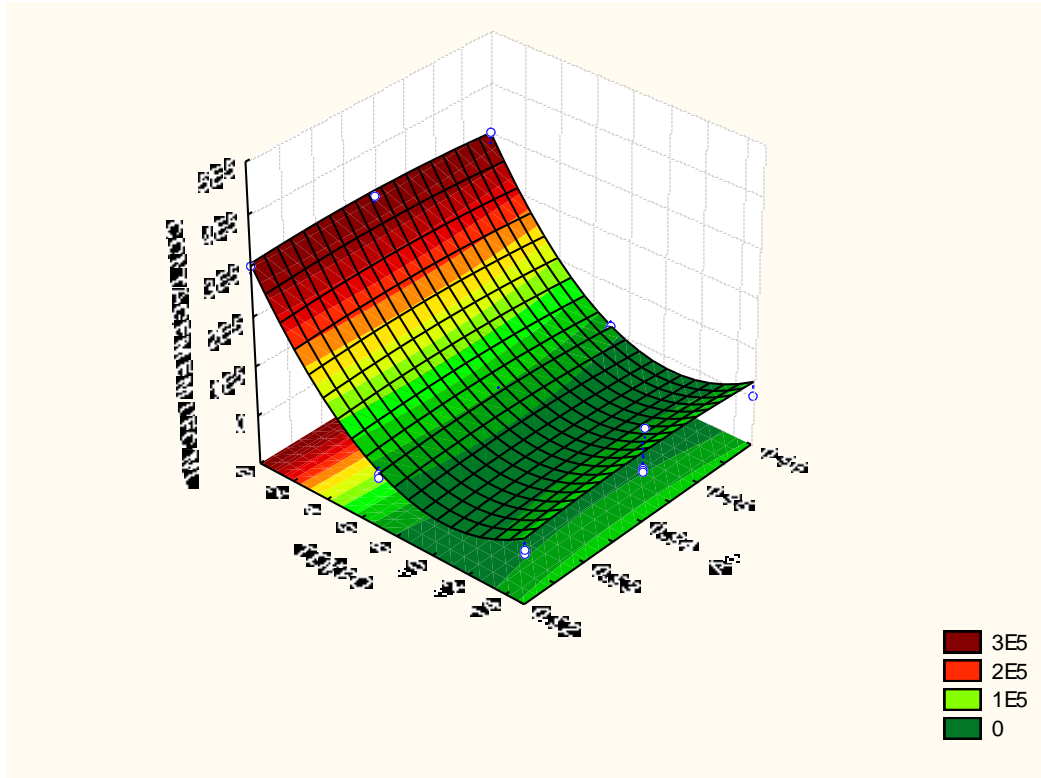


Figura 7. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 7 e temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa EC 784.

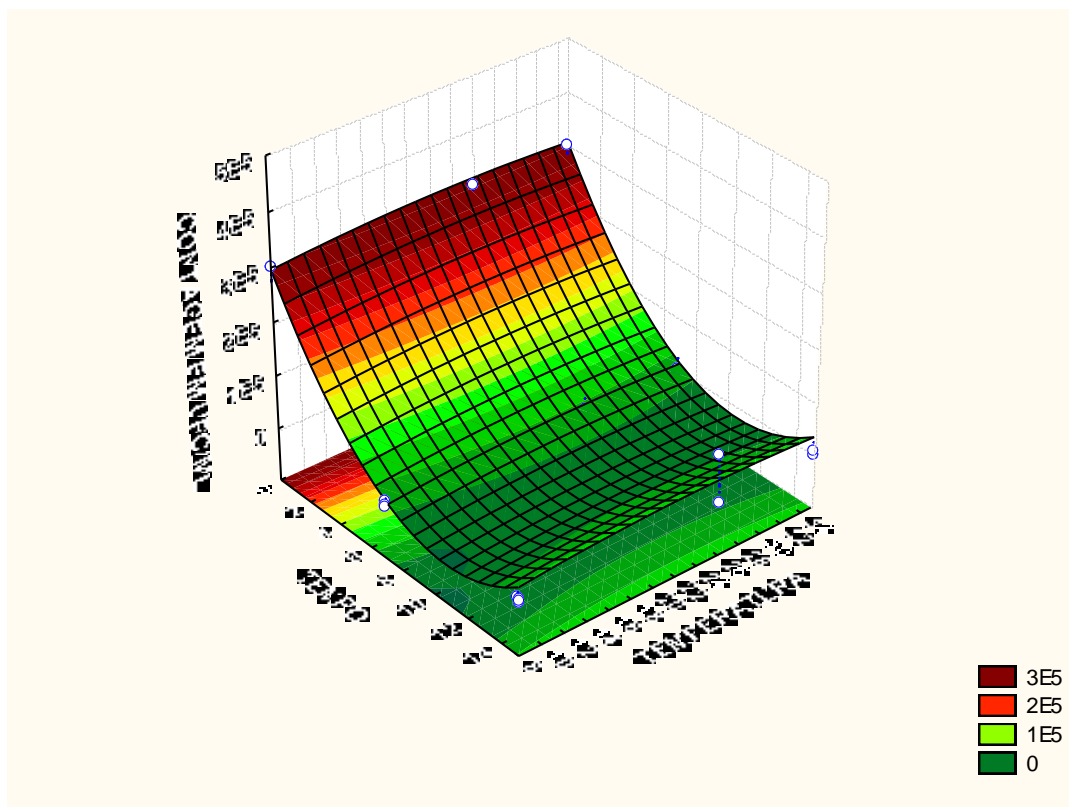


Figura 8. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de pH 7 e Aa de 0,94 sobre comportamento da cepa EC 784.

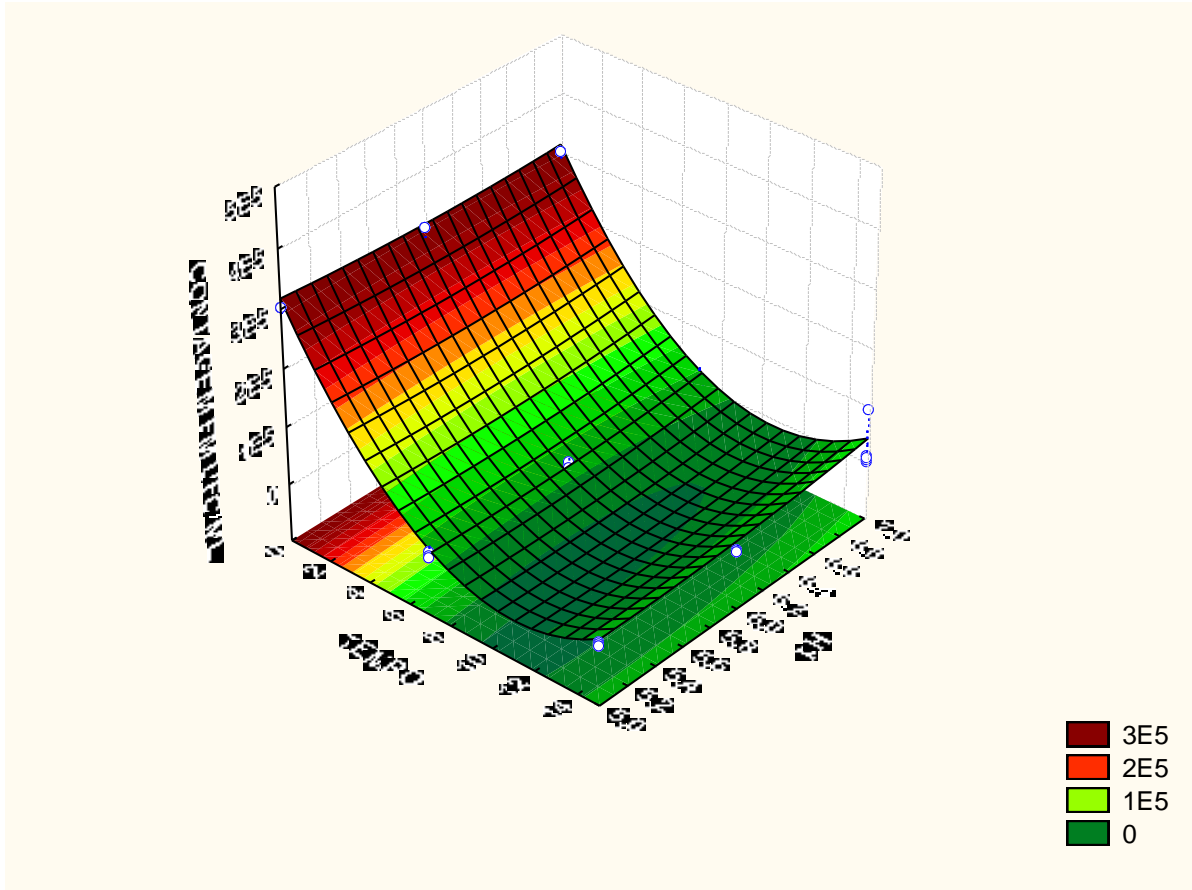


Figura 9. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,94 e temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa EC 784.

5.2 Cepa 1108/1 (humana)

Nenhuma condição favoreceu o aumento da população bacteriana em relação ao inóculo inicial. A melhor condição foi observada no teste 21 (pH 7, Aa de 0,96 a 8°C por 15 dias). Na condição de pH 7, Aa de 0,92 a 35°C por 15 dias (teste 27) não foi possível recuperar nenhuma célula viável (**Tabela 6**).

Tabela 6. Contagem de células viáveis (UFC/mL) de STEC 1108/1 a partir dos 27 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4.

Teste	Células viáveis UFC/mL ^a		
	A	B	C
1	3 X 10 ^{5b}	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
2	6,1 x 10 ³	7,3 x 10 ³	6,2 x 10 ³
3	1,2 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴
4	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
5	1,0 x 10 ³	1,6 x 10 ³	2,5 x 10 ³
6	3,0 X10 ¹	2,5 X10 ¹	2,5 X10 ¹
7	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
8	1,3 x 10 ²	2,5 x 10 ²	1,0 x 10 ²
9	1,8X10 ¹	2,0 X10 ¹	3,4 X10 ¹
10	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
11	5,9 x10 ³	5,7 x10 ³	3,9 x10 ³
12	4,5 x10 ³	6,4 x10 ³	6,7 x10 ³
13	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
14	2,7 X 10 ³	2,8 X 10 ³	2,6 X 10 ³
15	0	0	5,8
16	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
17	9,4	6,8	7
18	2,2X10 ⁴	1,5X10 ⁴	2,0X10 ⁴
19	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
20	5,6X10 ³	4,6X10 ³	4,5X10 ³
21	1,5X10 ⁵	1,0X10 ⁵	1,0X10 ⁵
22	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
23	3,2X10 ⁴	2,3X10 ⁴	2,6X10 ⁴
24	6,5 X 10 ²	6,5X10 ²	7,5X10 ²
25	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
26	1,5X10 ¹	1,6 X10 ¹	1,5X10 ¹
27	0	0	0

a: UFC: unidade formadora de colônia por mL de soro de QMF. b: Inóculo inicial

Todas as variáveis, individuais e combinadas, apresentaram efeito significativo sobre a resposta, sendo o efeito linear (L) da variável tempo o mais relevante. Esse efeito foi negativo (-189,185), explicando, desta forma, a diminuição da população da cepa humana 1108/1 com o aumento do tempo. As outras variáveis independentes ou combinadas apresentaram baixo efeito significativo (**Figura 10**), mesmo assim estão qualificadas para compor a equação (**Figura 11**). O R² foi igual a 0,99, ou seja, o conjunto de fatores explica 99% da variabilidade, podendo ser observado visualmente pelo gráfico da **Figura 12**.

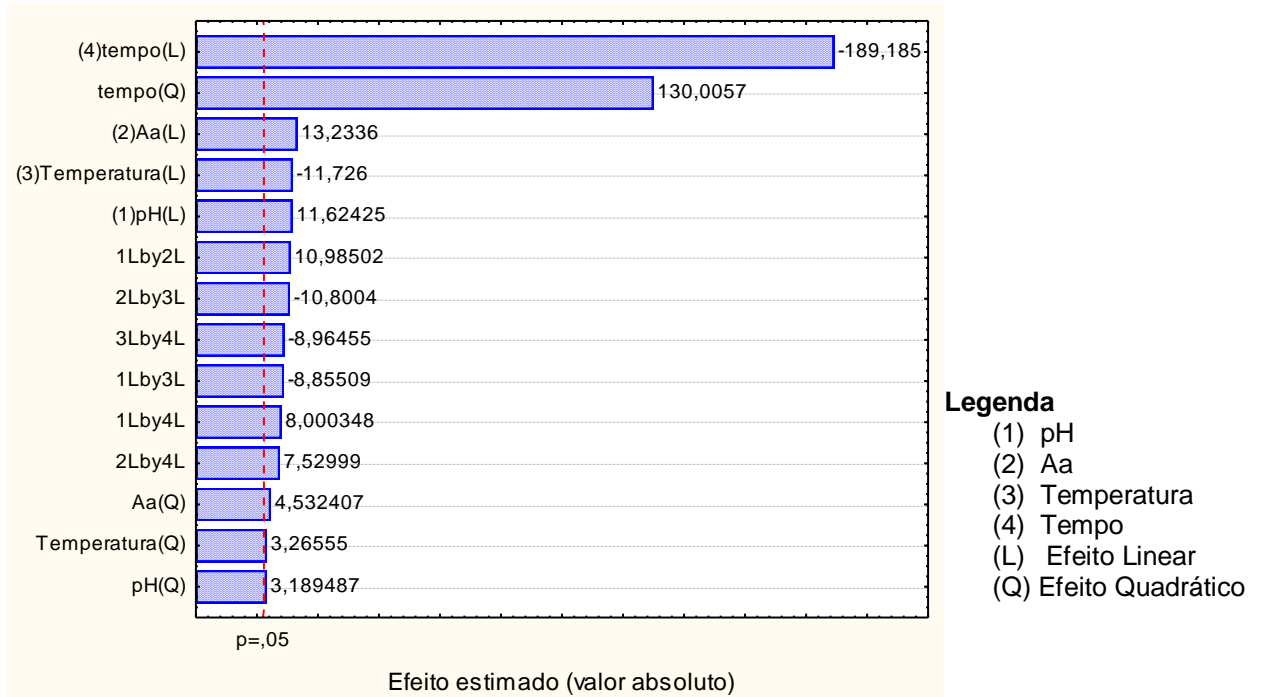


Figura 10. Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa 1108/1.

$$\begin{aligned}
 1108/1 = & -13865 + (16715 \cdot \text{pH}) + (8664 \cdot \text{pH}^2) + (19712 \cdot \text{Aa}) + (11401 \cdot \text{Aa}^2) - (17185 \cdot \text{T}) \\
 & + (9383 \cdot \text{T}^2) - (282096 \cdot \text{t}) + (328952 \cdot \text{t}^2) + (19730 \cdot \text{pH} \cdot \text{t}) - (15560 \cdot \text{pH} \cdot \text{T}) + (14372 \cdot \\
 & \text{pH} \cdot \text{t}) - (19898 \cdot \text{Aa} \cdot \text{T}) + (14042 \cdot \text{Aa} \cdot \text{t}) - (16484 \cdot \text{T} \cdot \text{t})
 \end{aligned}$$

Figura 11. Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa 1108/1.

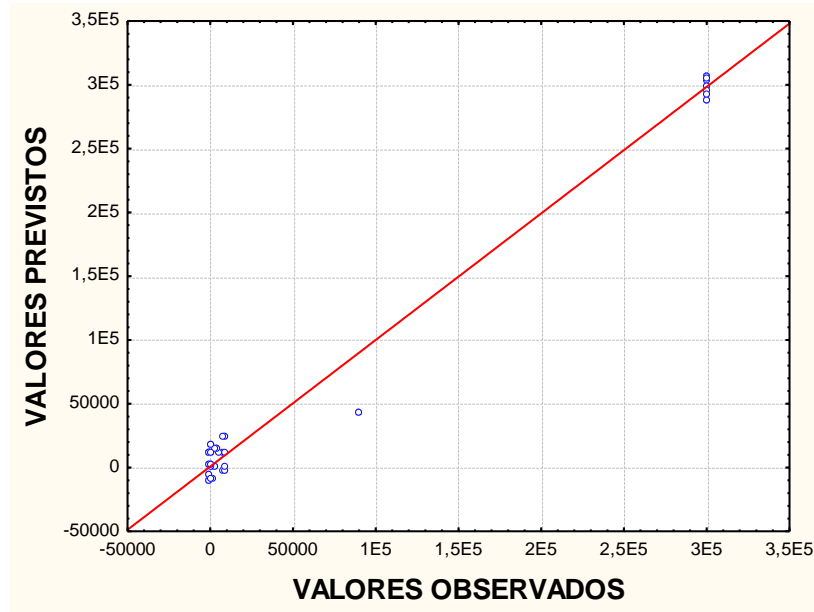


Figura 12. Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa 1108/1.

A representação gráfica do modelo ilustra a diminuição da população bacteriana com o aumento do tempo em diferentes valores de Aa em condições de pH 7,0 e temperatura de 8°C. Nestas condições observou-se um ligeiro aumento da população em valores de Aa mais elevados (**Figura 13**). Resultados parecidos são observados quando varia o pH em condições de Aa de 0,96 (**Figura 14**). Quando se varia a temperatura em condições de Aa de 0,96, observa-se um ligeiro aumento da população conforme a diminuição da temperatura (**Figura 15**).

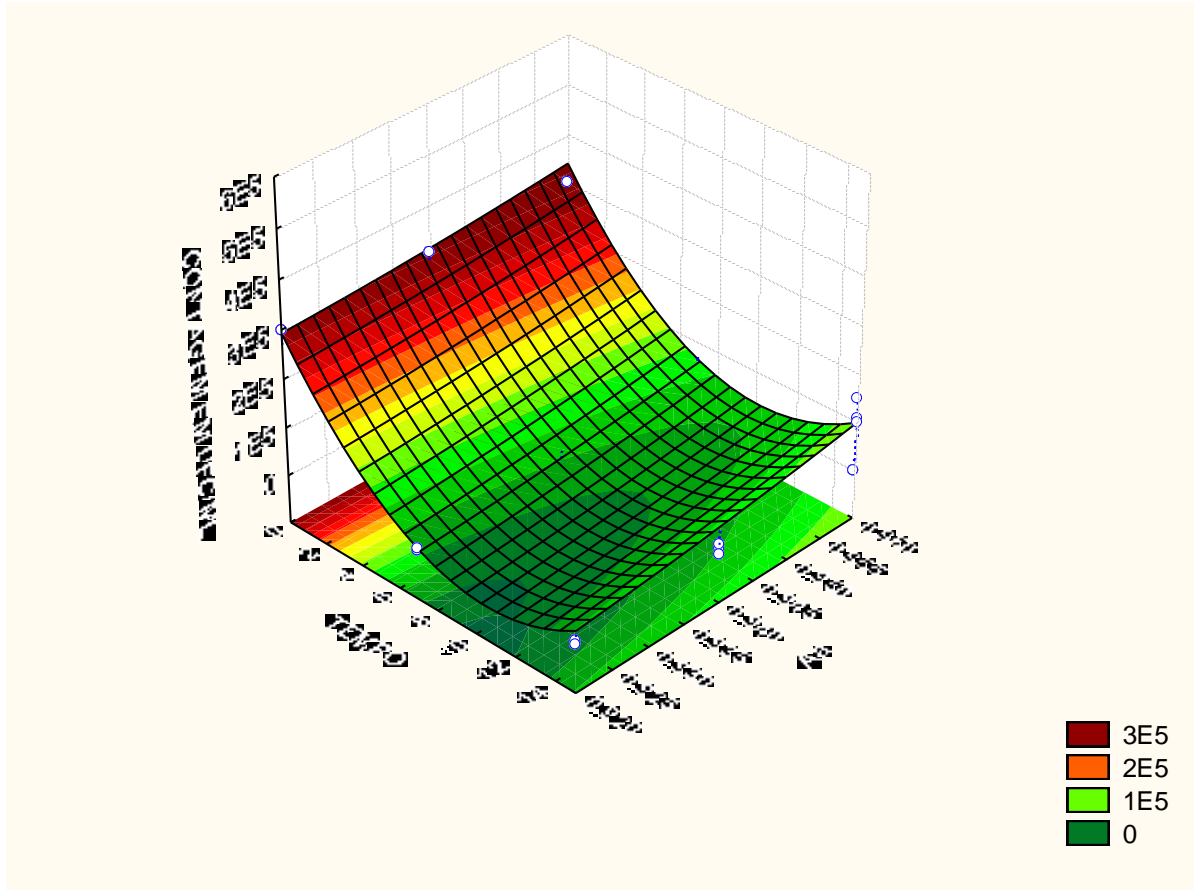


Figura 13. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 7 e temperatura de 8°C sobre comportamento da cepa 1108/1.

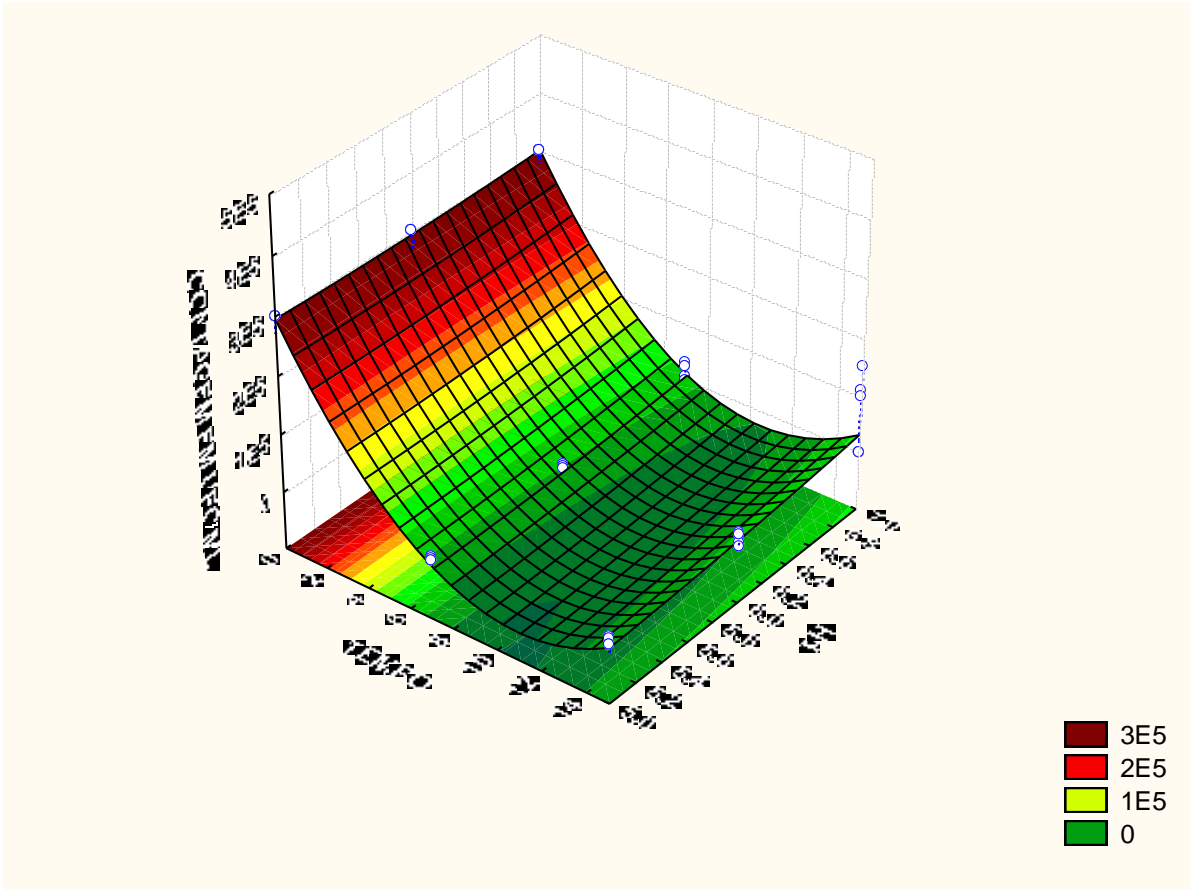


Figura 14. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,96 e temperatura de 8°C sobre comportamento da cepa 1108/1

Em condição de pH 7 e Aa 0,96 observou-se a redução da população bacteriana com o aumento do tempo, em diferentes níveis de temperatura (**Figura 15**).

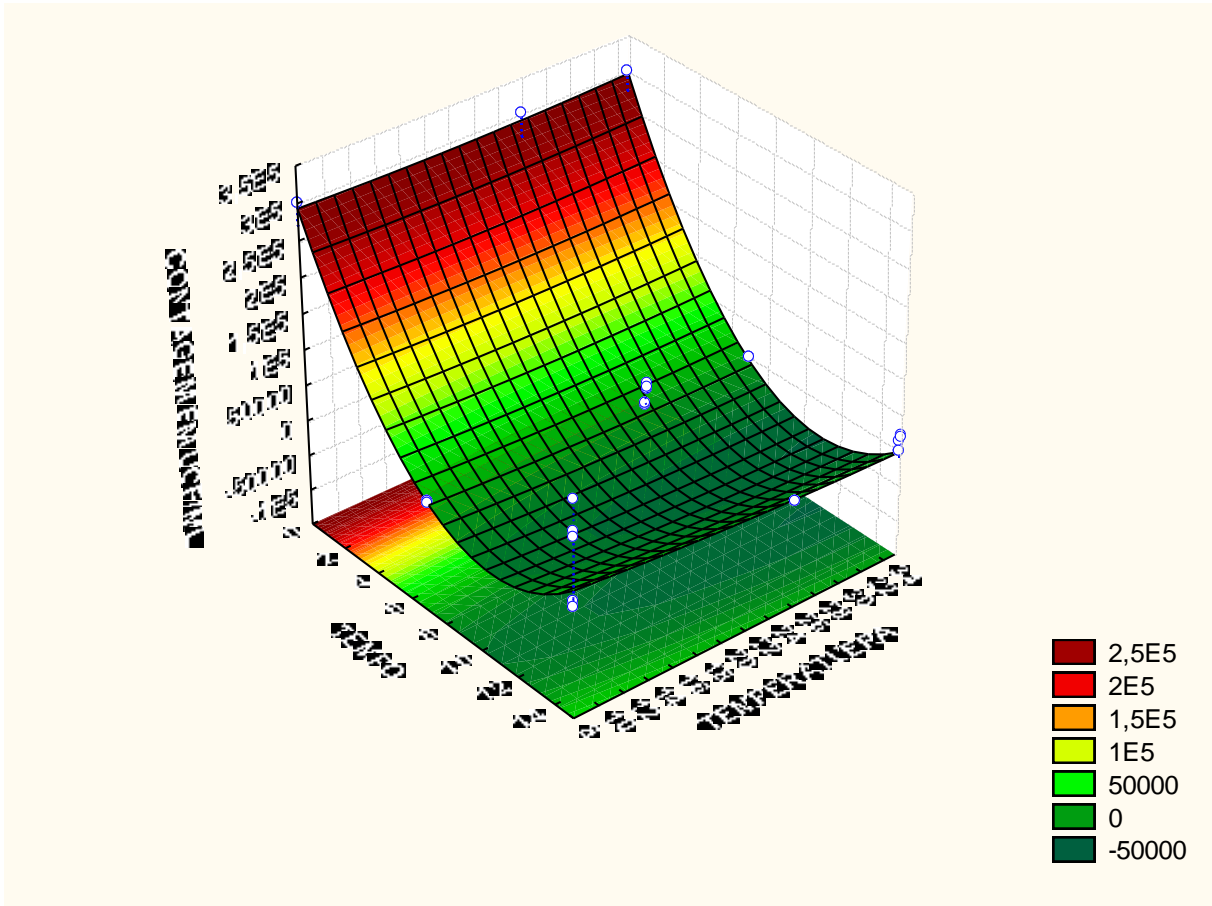


Figura 15. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,96 e pH 7 sobre comportamento da cepa 1108/1.

5.3 Cepa 702/1 (bovina)

As condições apresentadas nos testes 5 (pH 5, Aa 0,94, 26°C por 7 dias) e 26 (pH 7, Aa 0,94, 35°C por 7 dias) permitiram o aumento da população bacteriana acima do inóculo inicial, sendo este último teste a melhor condição para esta cepa. O teste 9 (pH 5, Aa 0,96, 35°C por 15 dias) ofereceu as piores condições para a cepa bovina 702/1 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Contagem de células viáveis (UFC/mL) de RJ 702/1 a partir dos 27 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4.

Teste	Células viáveis UFC/mL ^a		
	A	B	C
1	3 X 10 ^{5b}	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
2	3,7 X 10 ³	4,0 X 10 ³	4,0 X 10 ³
3	3,2 X 10 ³	4,9 X 10 ³	3,5 X 10 ³
4	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
5	1,1 X 10 ⁶	1,1 X 10 ⁶	1,2 X 10 ⁶
6	2,5 X 10 ²	2,5 X 10 ²	3,8 X 10 ²
7	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
8	3,3 X 10 ²	2,9 X 10 ²	1,7 X 10 ²
9	14	10	12
10	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
11	7,3 X 10 ³	8,0 X 10 ³	5,0 X 10 ³
12	6,0 X 10 ³	6,5 X 10 ³	1,3 X 10 ³
13	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
14	2,1 X 10 ⁵	2,7 X 10 ⁵	1,2 X 10 ⁵
15	2,6 X 10 ²	2,5 X 10 ²	5,0 X 10 ¹
16	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
17	1,1 X 10 ³	1,5 X 10 ³	2,1 X 10 ³
18	5	2,6 X 10 ²	50
19	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
20	1,5 X 10 ²	1,0 X 10 ²	1,5 X 10 ²
21	3,6 X 10 ³	2,0 X 10 ³	3,3 X 10 ³
22	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
23	1,2 X 10 ⁴	1,1 X 10 ⁴	1,1 X 10 ⁴
24	7,5 X 10 ⁴	9,6 X 10 ⁴	7,6 X 10 ⁴
25	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
26	4,8 X 10 ⁶	6,6 X 10 ⁶	5,5 X 10 ⁶
27	3	40	45

a: UFC: unidade formadora de colônia por ml de soro de QMF. b: Inóculo inicial

Com exceção da interação entre pH e tempo, as variáveis, individuais e combinadas, apresentaram efeito significativo sobre a resposta,. A variável que apresentou maior efeito significativo foi o tempo (Q) de modo que com o seu aumento, houve diminuição da população bacteriana (-19,87). A interação entre as variáveis pH e temperatura apresentaram efeito significativo relevante (**Figura 16**).

O R² do modelo foi de 0,3, mostrando uma baixa adequação deste desenho experimental à cepa bovina. A **Figura 17**, que apresenta o gráfico das respostas previstas contra as respostas observadas, ilustra a inadequação do modelo, com isso, o modelo não será considerado para análise.

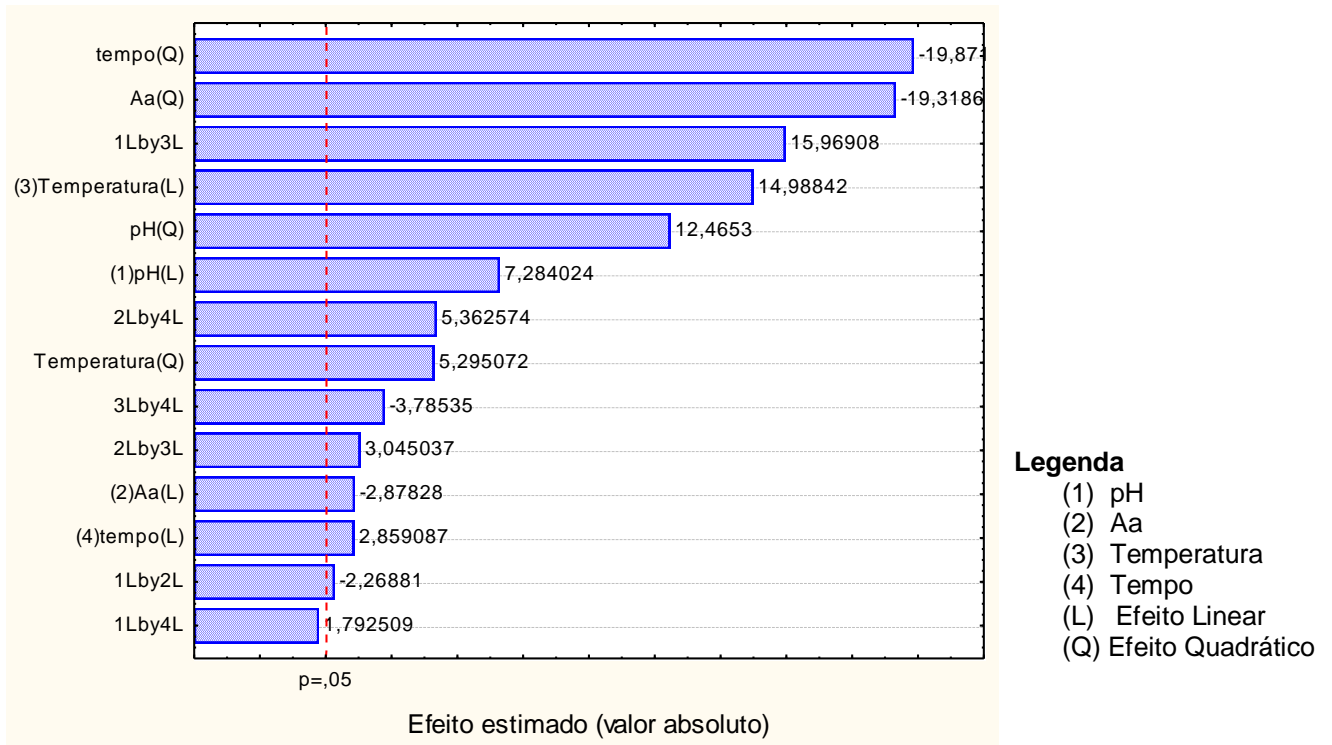


Figura 16. Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa RJ 702/1.

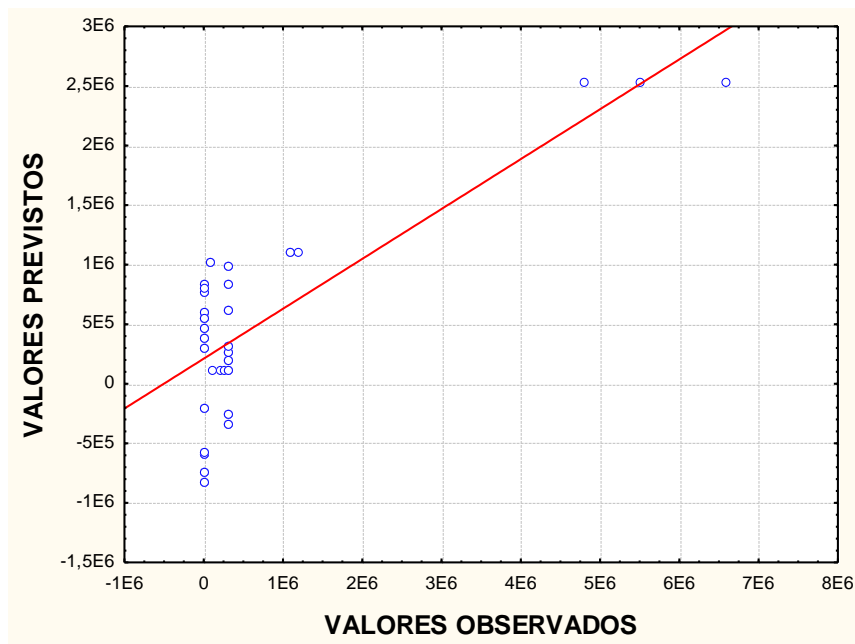


Figura 17. Gráfico de resíduo da relação dos valores observados e previstos para a cepa RJ 702/1.

5.4 Cepa de coliforme termotolerante

O estudo da cepa de coliforme termotolerante foi realizado a fim de se comparar o comportamento de uma cepa de *E. coli* não patogênica, isolada de queijo minas frescal, isenta de fatores de virulência com as cepas STEC O113:H21 potencialmente patogênicas, objeto de estudo. Apenas no teste 17 (pH 6, Aa 0,96, 35°C e 7 dias) observou-se um pequeno aumento do número de células em relação ao inóculo inicial. A pior condição foi apresentada no teste 27 (pH 7, Aa 0,92, 35°C e 15 dias) onde não foi possível recuperar nenhuma célula viável (**Tabela 8**).

Tabela 8. Contagem de células viáveis (UFC/mL) de coliforme termotolerante a partir dos 81 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4.

Teste	Células viáveis UFC/mL ^a		
	A	B	C
1	3 X 10 ^{5b}	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
2	1,0 X 10 ³	3,3 X 10 ³	1,6 X 10 ³
3	8,1 X 10 ³	7,0 X 10 ³	5,1 X 10 ³
4	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
5	2,7 X 10 ⁴	2,7 X 10 ⁴	3,0 X 10 ⁴
6	1,0 X 10 ³	2,1 X 10 ⁴	1,0 X 10 ³
7	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
8	2,2 X 10 ²	2,2 X 10 ²	3,3 X 10 ²
9	1	10	2
10	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
11	1,5 X 10 ⁴	1,8 X 10 ⁴	1,3 X 10 ⁴
12	1,5 X 10 ⁴	2,1 X 10 ⁴	1,6 X 10 ⁵
13	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
14	1,5 X 10 ²	1,0 X 10 ²	1,3 X 10 ²
15	1,0 X 10 ⁵	2,0 X 10 ⁵	2,2 X 10 ⁵
16	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
17	3,8 X 10 ⁵	4,9 X 10 ⁵	3,9 X 10 ⁵
18	3	3	1
19	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
20	1,5 X 10 ⁴	3,0 X 10 ⁴	1,5 X 10 ⁴
21	1,8 X 10 ⁴	2,5 X 10 ⁴	2,5 X 10 ⁴
22	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
23	3,3 X 10 ⁴	1,6 X 10 ⁴	2,2 X 10 ⁴
24	3,4 X 10 ²	3,9 X 10 ²	3,3 X 10 ²
25	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
26	5	16	8
27	0	0	0

a: UFC: unidade formadora de colônia por ml de soro de QMF. b: Inóculo inicial

Com exceção do efeito linear do pH, todas as outras variáveis individuais apresentaram efeito significativo sobre o comportamento bacteriano. Novamente a variável tempo apresentou o efeito mais relevante (-42,0062), sendo este efeito negativo (**Figura 18**). Apenas as variáveis individuais e combinadas de efeito significativo entraram na confecção da equação, onde R² foi igual a 0,77 (**Figura 19**). A **Figura 20** ilustra a relação entre os valores observados e previstos. Apesar do R² estar dentro dos valores previamente selecionados para avaliação da adequação do modelo (SHEEN; HWANG, 2009), observa-se vários pontos fora do eixo.

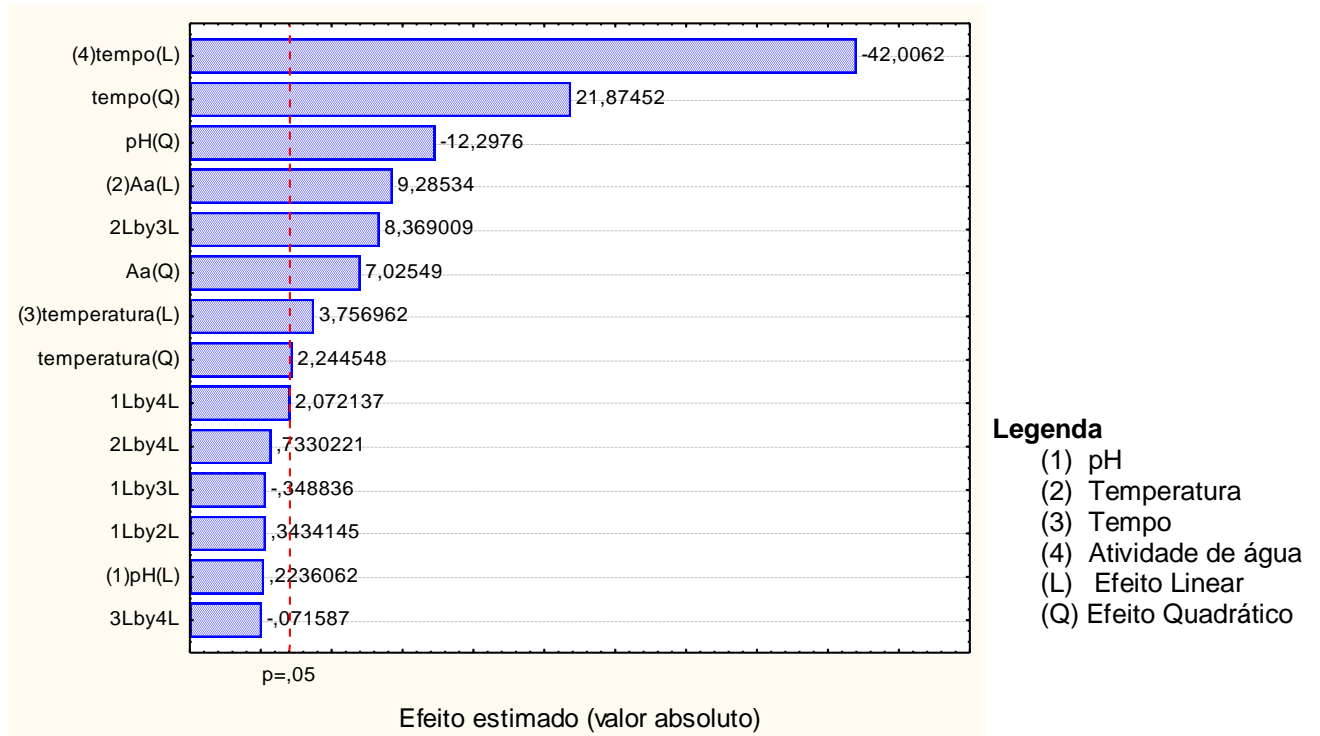


Figura 18. Gráfico de Pareto para os efeitos de quatro fatores (temperatura, tempo, pH e Aa) sobre a cepa de coliforme termotolerante.

$$\text{Coliforme termotolerante} = 58618 - (147668 \cdot \text{pH}^2) + (61149 \cdot \text{Aa}) + (78134 \cdot \text{Aa}^2) + (24342 \cdot \text{T}) + (28515 \cdot \text{T}^2) - (276930 \cdot \text{t}) + (244712 \cdot \text{t}^2) + (16457 \cdot \text{pH} \times \text{t}) + (68170 \cdot \text{Aa} \cdot \text{T})$$

Figura 19. Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa de coliforme termotolerante.

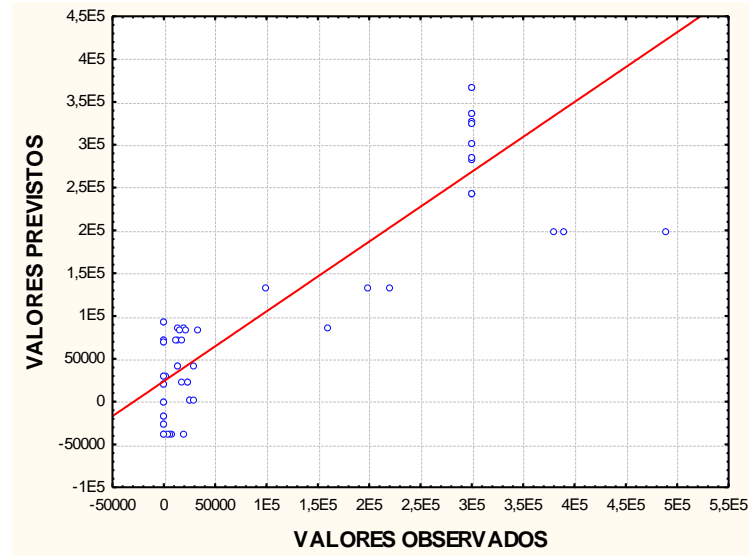


Figura 20. Gráfico de resíduo da relação dos valores observados e previstos para a cepa de coliforme termotolerante.

A **Figura 21** ilustra o modelo gerado, onde se observa a diminuição da população bacteriana com o aumento do tempo em função do pH nas condições de Aa 0,96 a 35°C. Nota-se um pequeno aumento da população bacteriana em valor de pH em torno de 6,0.

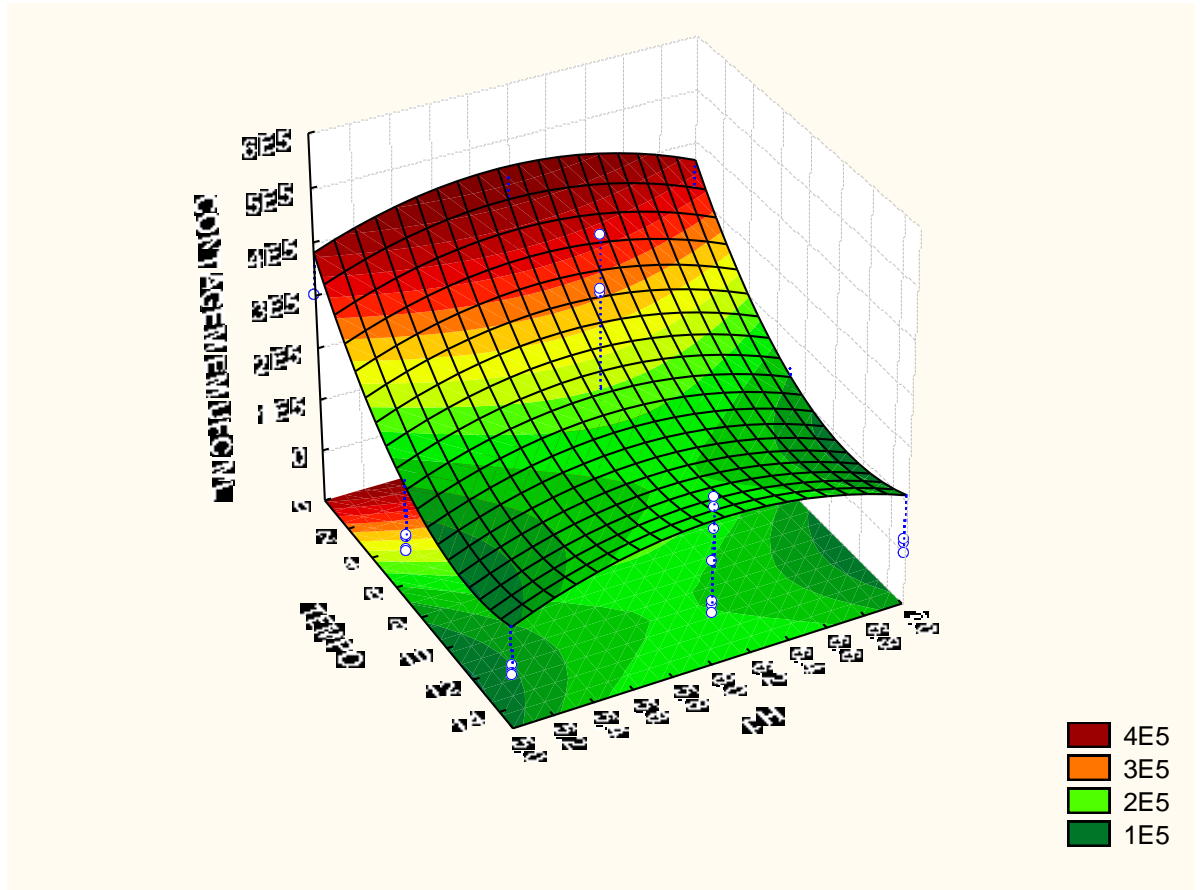


Figura 21. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,96 e 35°C sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante

Em condição de pH 6,0 observou-se a diminuição da contagem bacteriana, contudo a 35°C, em Aa de 0,96 o efeito da temperatura foi maior (**Figura 22**) e sob esta mesma temperatura, observou-se a maior contagem bacteriana em Aa de 0,96 (**Figura 23**).

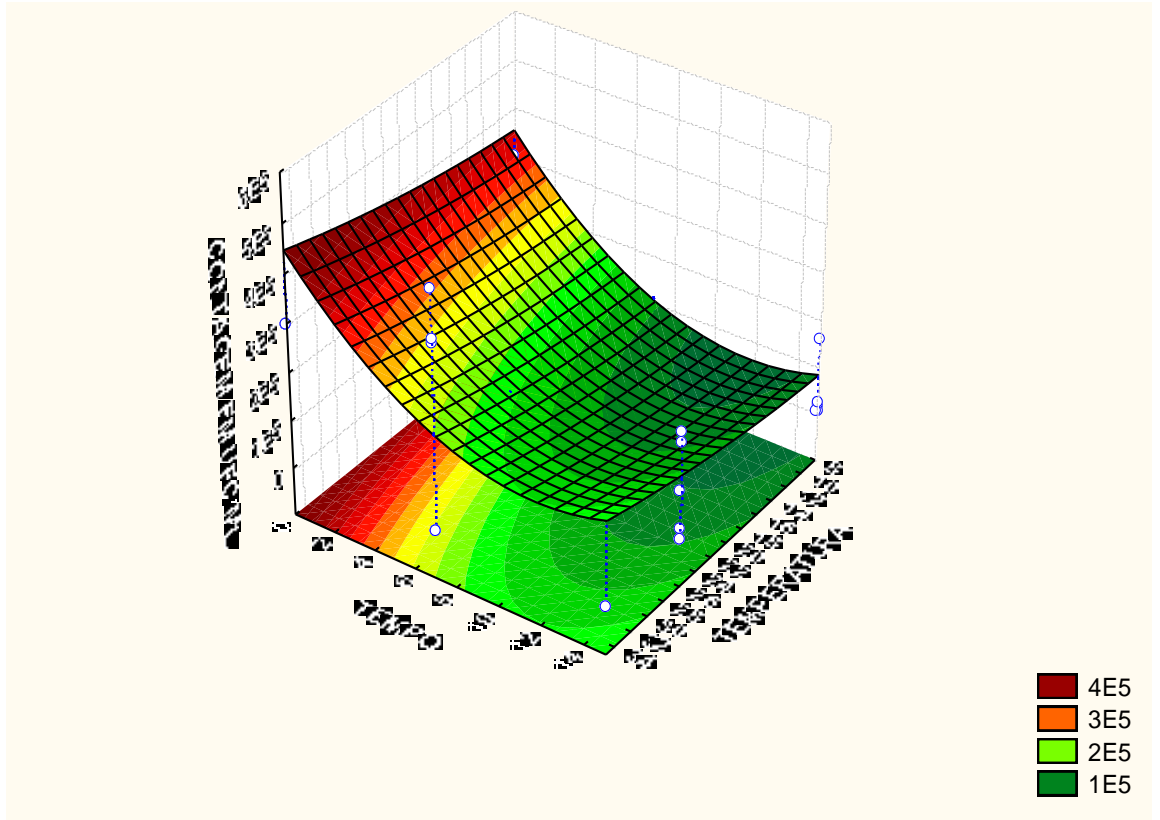


Figura 22. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,96 e pH 6 sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante.

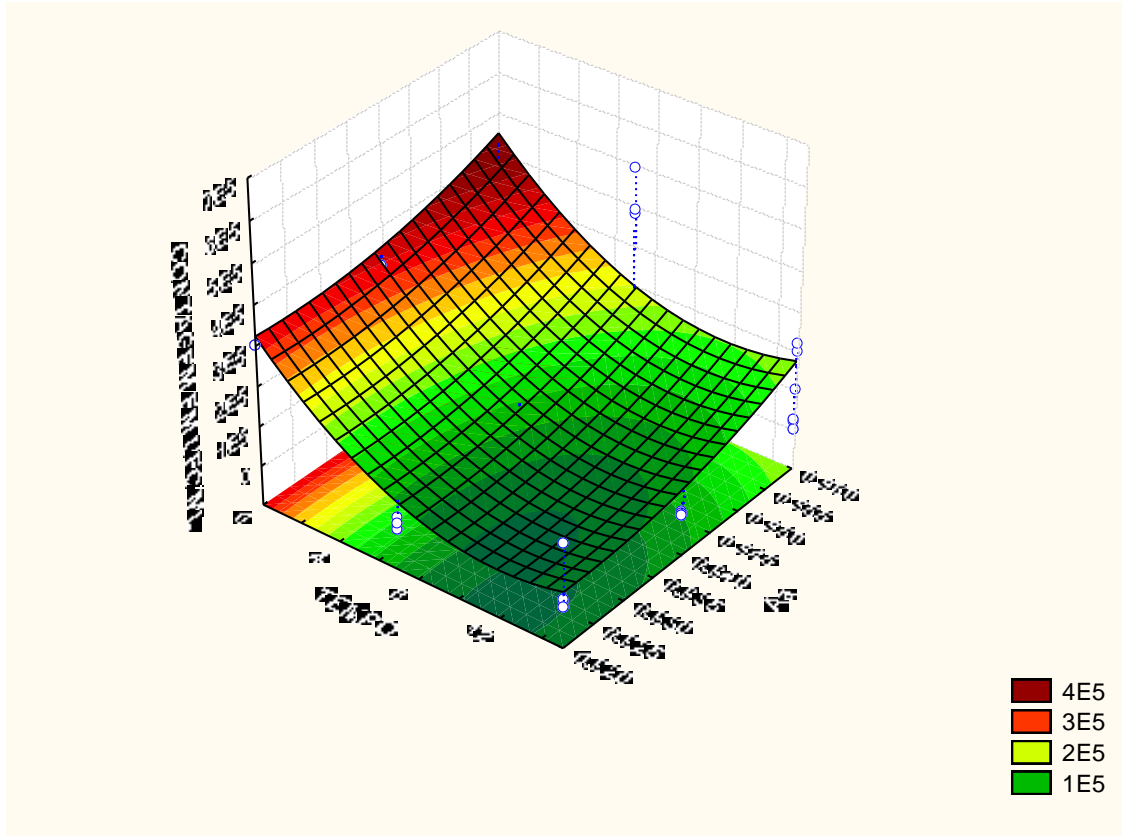


Figura 23. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 6 a temperatura de 35°C sobre comportamento da cepa de coliforme termotolerante.

5.5 Cepa DH5 α

A cepa laboratorial DH5 α (BLATTNER et al., 1997) foi incluída no estudo com a finalidade de comparar-se as cepas STEC O113:21 potencialmente patogênica com uma cepa livre de fatores de virulência.

Observou-se que em nenhuma das condições avaliadas houve aumento do número de células em relação ao inóculo inicial. As condições apresentadas no teste 5 (pH 5; Aa 0,94; 26°C por 7 dias) foram as que resultaram em maior aumento populacional. As piores condições foram observadas nos testes: 8 (pH 5, Aa 0,92, 35°C por 7 dias) e 18 (pH6, Aa 0,94, 35°C por 15 dias (**Tabela 9**)).

Tabela 9. Contagem de células viáveis (UFC/mL) de DH5 α a partir dos 27 experimentos em soro de QMF de acordo com a Tabela 4.

Teste	Células viáveis UFC/mL ^a		
	A	B	C
1	3 X 10 ^{5b}	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
2	5,3 x 10 ¹	5,3 x 10 ¹	5,4 x 10 ¹
3	2,8 x 10 ²	2,7 x 10 ²	1,8 x 10 ²
4	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
5	4,1 x 10 ⁴	5,3 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
6	1 x 10 ¹	1 x 10 ¹	0
7	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
8	0	0	0
9	2,5 x 10 ¹	2,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ¹
10	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
11	1,4 x 10 ¹	1,4 x 10 ¹	2,2 x 10 ¹
12	5,0	0	0
13	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
14	2,1 x 10 ²	2,4 x 10 ²	3,9 x 10 ²
15	9,4 x 10 ³	5,0 x 10 ³	5,0 x 10 ³
16	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
17	2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ¹	2
18	0	0	0
19	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
20	2,5 x 10 ²	6,0 x 10 ²	2,2 x 10 ²
21	2,2 x 10 ³	2,2 x 10 ²	1,9 x 10 ³
22	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
23	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴
24	7	2,0 x 10 ¹	3
25	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵	3 X 10 ⁵
26	1	1	0
27	0	1	4

a: UFC: unidade formadora de colônia por ml de soro de QMF. b: Inóculo inicial

A variável tempo (L) apresentou maior efeito significativo sobre a resposta (-584,19), sendo observado a diminuição da população com o aumento dessa variável. As outras variáveis independentes ou combinadas apresentaram baixo efeito significativo, sendo que a variável individual temperatura (L), bem com sua interação com o pH não apresentaram efeito significativo sobre a resposta (**Figura 24**). As variáveis que apresentaram efeito significativo foram utilizadas para a confecção da equação representada na **Figura 25**, com R² igual a

0,99. A relação dos resultados observados e previstos ilustra a adequação do modelo (Figura 26).

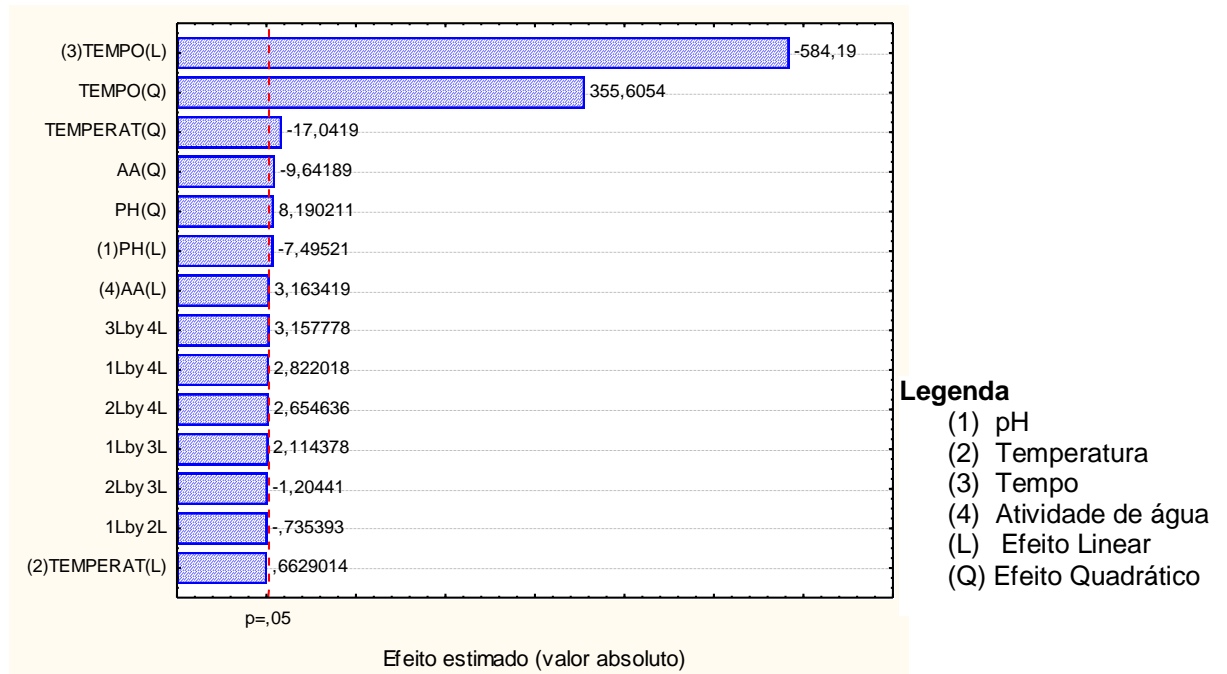


Figura 24. Gráfico de Pareto para os efeitos dos quatro fatores estudados (pH, temperatura, tempo e Aa) sobre a cepa DH5α.

$$DH5\alpha = 2151 - (3692 \cdot pH) + (7622 \cdot pH^2) - (16776 \cdot T^2) - (298426 \cdot t) + (308255 \cdot t^2) + (1614 \cdot Aa) - (8309 \cdot Aa^2) + (1301 \cdot pH \cdot t) + (1736 \cdot pH \cdot Aa) + (1676 \cdot T \cdot Aa) + (2017 \cdot t \cdot Aa)$$

Figura 25. Equação gerada a partir do modelo de regressão para a cepa DH5α.

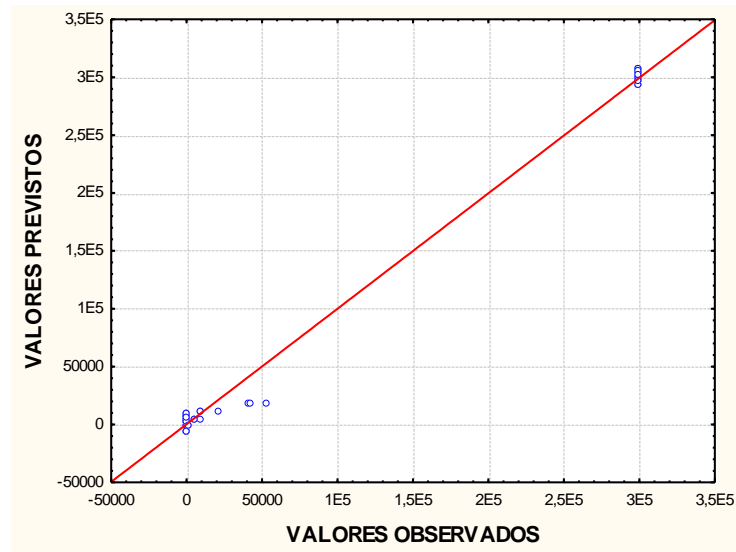


Figura 26. Gráfico de resíduo que ilustra a relação dos valores observados e previstos para a cepa DH5 α .

O gráfico que ilustra o modelo gerado, demonstra a diminuição da contagem bacteriana com o aumento do tempo em diferentes valores de temperatura sob as condições de Aa 0,94 e pH 5,0 (**Figura 27**), assim como em diferentes valores de Aa em condições de pH 5,0 a 26°C (**Figura 28**).

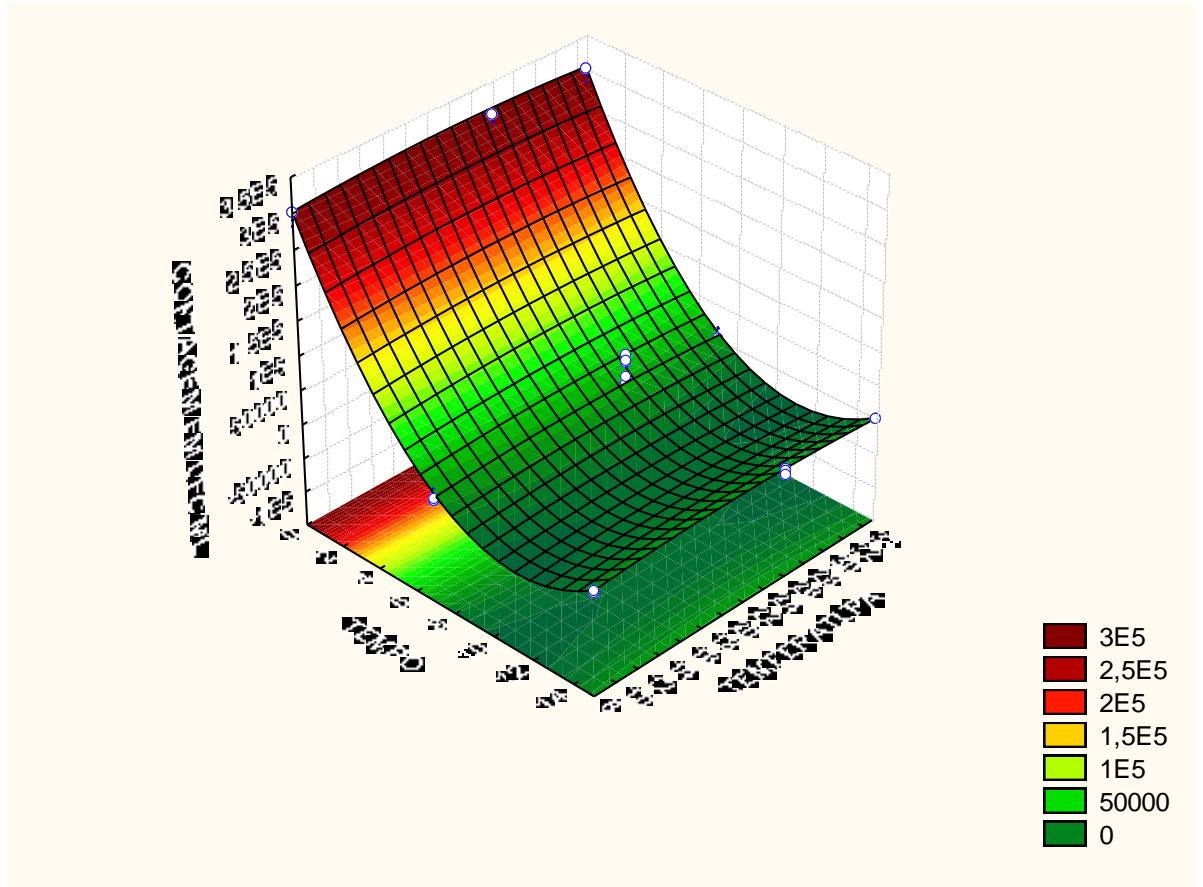


Figura 27. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis temperatura e tempo, nas condições de Aa 0,94 e pH 5 sobre comportamento da cepa DH5 α .

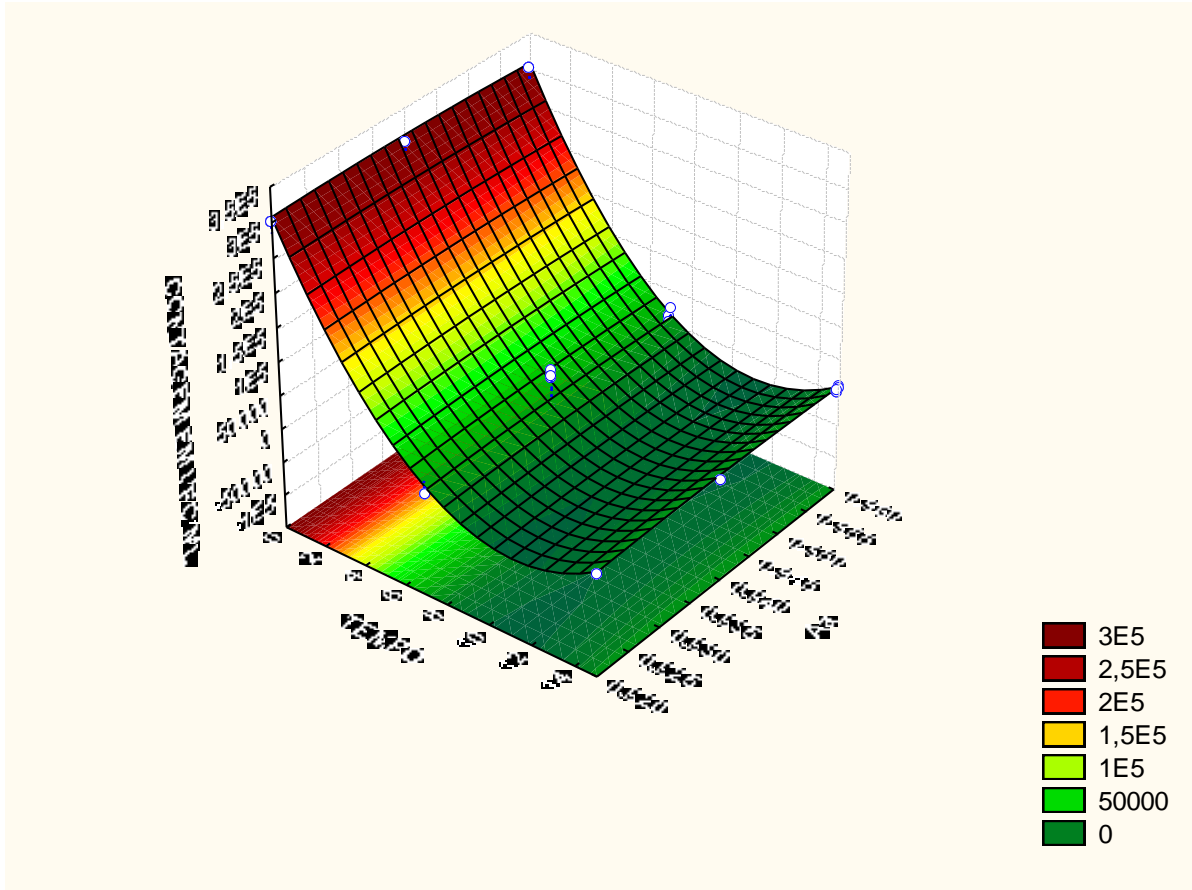


Figura 28. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis Aa e tempo, nas condições de pH 5 a temperatura de 26°C sobre comportamento da cepa DH5α

A **Figura 29** ilustra a interação entre as variáveis pH e tempo nas condições de Aa 0,94 a temperatura de 26°C. Nota-se que a variável tempo também, como nos outros gráficos, exerceu efeito negativo sobre a população bacteriana, em relação ao pH, quanto mais elevado maior contagens de UFC.

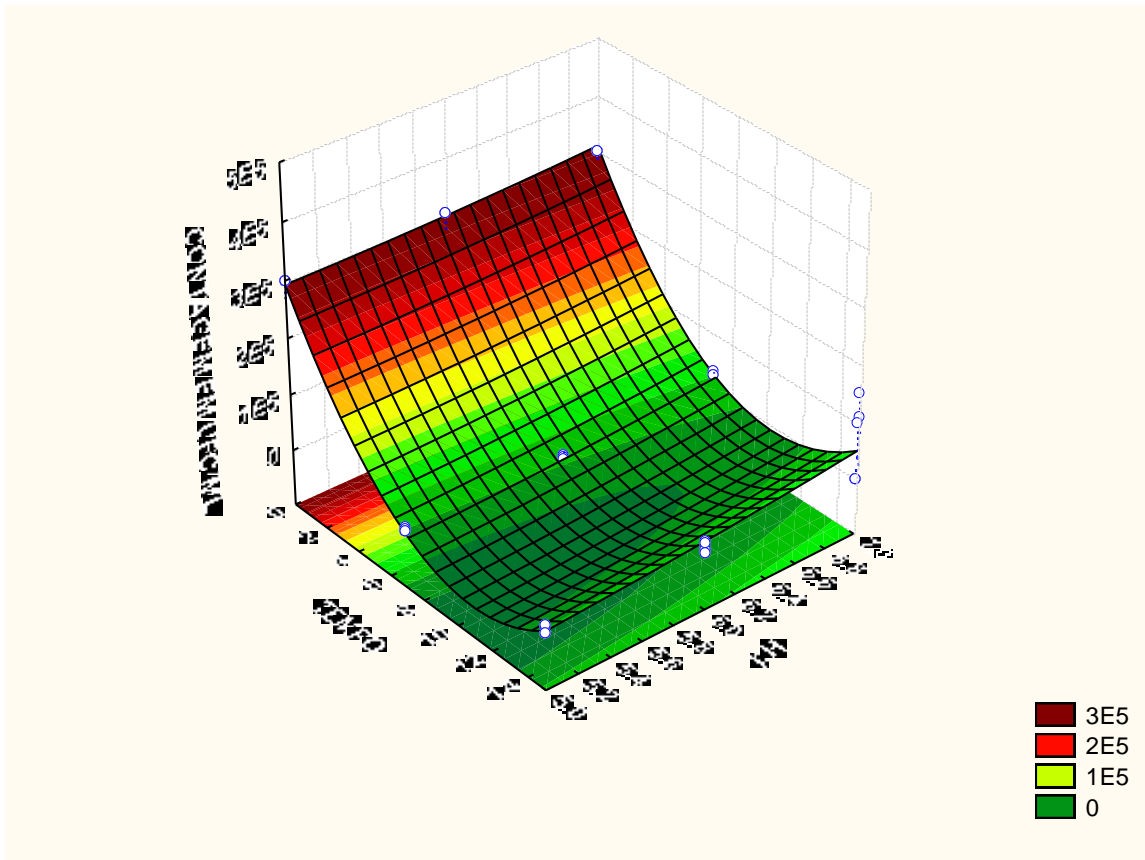


Figura 29. Superfície de resposta que representa o efeito da interação entre as variáveis pH e tempo, nas condições de Aa 0,94 a 26°C sobre comportamento da cepa DH5 α .

5.6 Comparação entre as cepas estudadas

A cepa RJ 702/1 não foi incluída para comparação com as demais devido ao baixo valor de R^2 .

Para as cepas avaliadas, foi possível notar que a variável tempo apresentou maior efeito significativo sobre o comportamento bacteriano, sendo este efeito negativo. Todas as variáveis apresentaram efeito significativo, individual e combinado, sobre o comportamento das STEC O113:H21 estudadas.

As cepas EC 784 e DH5 α não apresentaram alteração no comportamento com a variação das temperaturas. As cepas 1108/1 e de coliforme termotolerante apresentaram aumento da população bacteriana com o aumento dos valores de Aa. Já as cepas EC 784 e DH5 α não apresentaram alteração.

Todas as cepas pertencentes ao sorotipo O113:H21, nas condições avaliadas, apresentaram comportamento similar ao da cepa de coliforme termotolerante.

6 DISCUSSÃO

O modelo estatístico empregado no estudo foi adequado para descrever o comportamento das cepas, STEC O113:H21 EC784 e 1108/1 e das cepas de *E. coli* DH5 α e de coliforme termotolerante, já que os coeficientes de determinação (R^2) foram acima de 0,7 (SHEEN; HWANG, 2009). Contudo o Gráfico de Dispersão da cepa de coliforme termotolerante mostrou a distância dos valores observados e previstos em relação ao eixo. Apesar desta observação, considerou-se o R^2 , que para cepa de coliforme foi 0,77, como critério de avaliação do modelo. O planejamento experimental que modela o comportamento da cepa bovina RJ 702/1 não foi adequado (R^2 de 0,3).

Modelos estatísticos são muito utilizados na microbiologia preditiva de alimentos. ROSS et al. (2003) combinaram valores mínimos e máximos de temperatura, Aa, pH e concentração de ácido lático na construção de um modelo estatístico a fim de avaliar o crescimento de *E. coli*, constatando que o modelo utilizado foi eficaz no estudo. SHEEN; HWANG (2009), utilizaram um modelo matemático com a finalidade de prever a contaminação cruzada por O157:H7 em superfície de presunto fatiado no ato de corte, concluindo que o modelo empregado foi uma ferramenta útil na avaliação de risco deste tipo de contaminação neste alimento.

São escassos os relatos na literatura sobre o comportamento de STEC não-O157 sob condições que controlam o desenvolvimento microbiano em alimentos, sobretudo STEC LEE-negativas. STEC LEE-negativa do sorotipo O113:H21 tem sido relatada como importante agente etiológico de doenças em humanos em algumas regiões do mundo (PATON; PATON, 1999; BRETT et al., 2003). No Brasil esse sorotipo tem sido isolado com considerável frequência em fezes bovinas (JOAQUIM, 2002; GONZALEZ, 2003; IRINO 2005). Contudo, os relatos de seu isolamento a partir de alimentos são restritos (CERQUEIRA; TIBANA;

GUTH, 1997). Em vista disso, existe ainda a falta de informações sobre o comportamento deste sorotipo, envolvido em SHU, em alimentos.

Em relação aos processos utilizados na conservação de alimentos, a Teoria dos Obstáculos trata dos fatores intrínsecos e extrínsecos que, individualmente ou combinados, são responsáveis por tal conservação (LEISTNER, 1985). Sabe-se que a atuação sinérgica entre esses fatores é capaz de aumentar a vida útil do alimento, e conseqüentemente a sua qualidade. Esses cuidados observados na indústria de alimentos, como adição de antioxidantes e conservação através da atmosfera modificada, são importantes para a inocuidade do produto, desde que não interfira em suas características sensoriais (ALEGRE et al., 2010).

Os fatores intrínsecos (pH e Aa) e extrínsecos (tempo e temperatura) foram incluídos no estudo a fim de avaliar a influência de cada um de maneira individual e combinada no comportamento de cepas de STEC O113:H21, consideradas potencialmente patogênicas, devido a fonte de isolamento e/ou as características fenotípicas e genotípicas apresentadas, e comparar com o comportamento de cepas não patogênicas (coliforme termotolerante e *E. coli* DH5 α) testadas em iguais condições.

O tempo foi a variável que mais contribuiu para a redução da população bacteriana tanto das cepas de STEC O113:H21 como das cepas não patogênicas, quando combinado aos outros fatores. Os gráficos que ilustram a equação que modela o comportamento das cepas estudadas apontaram a redução da população bacteriana, podendo ser observada nas diferentes interações entre o tempo e os outros fatores estudados.

Por outro lado, o grupo de pesquisa do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHIMA) da UFF observou o aumento da população de STEC O157:H7 (cepa EDL 933) quando submetida as mesmas condições apresentadas neste trabalho (MELO, SANTOS, 2008). Desta forma, sugere-se que STEC O113:H21, pertencente ao mesmo patotipo do sorotipo O157:H7, apresenta comportamento distinto deste sorotipo quando submetida a algumas condições que controlam o desenvolvimento microbiano.

Neste estudo, a variação da temperatura, de 8°C a 35°C, não exerceu influência no comportamento das cepas EC 784 e DH5 α , ou seja, estas cepas apresentaram comportamento semelhante nos diferentes níveis de temperatura apresentados. No entanto, a temperatura de 8°C foi mais favorável para o aumento da população da cepa 1108/1. A cepa EDL 933 apresentou, como a cepa 1108/1, aumento da população nesta mesma temperatura, porém, a intensidade foi muito maior, sendo constatado comportamento psicrotrófico de EDL 933,

mesmo sob efeito de outros fatores que controlam o desenvolvimento bacteriano (dados ainda não publicados pelo LHIMA). Já a cepa de coliforme termotolerante apresentou aumento da população com a elevação da temperatura até 35°C. No Paraná, STEC O157:H7 e não-O157 (não-O113) isoladas de fezes de bovinos mantiveram populações estáveis e apresentaram crescimento, respectivamente, em carne moída e em leite experimentalmente contaminados, durante 30 dias a 8°C (TIMM et al., 2009). Outros autores avaliaram a capacidade de sobrevivência de STEC O157:H7 em queijo artesanal e industrial “Galotyri”, tradicional queijo cremoso da Grécia, em temperaturas de 4°C e 12°C, onde a melhor condição de sobrevivência foi a 12°C observando no entanto o declínio da população bacteriana no queijo industrial em comparação ao artesanal, em ambas as temperaturas consideradas (LEKKAS et al., 2006). DLAMINI; BUYS (2009) pesquisaram a sobrevivência e o crescimento de STEC O157:H7 em leites fermentados “Amasi” comercial e tradicional e constataram a sua sobrevivência no leite comercial após 2 dias armazenado em temperatura de 7°C. PIGATTO et al. (2009) concluíram que cepas de STEC não-O157 com diferentes atributos de virulência podem permanecer viáveis, por pelo menos 10 dias em QMF mantido sob refrigeração (4°C). Em outro estudo, foi constatado que 43% das cepas de STEC O157:H7 tiveram a capacidade de sobreviver cerca de 22 a 24 meses a 4°C em alimentos desidratados como amendoins torrados, chocolates e batatas chips (HIRAMATSU et al., 2005).

TIMM et al. (2009) demonstraram que isolados de STEC não-O113 e não-O157 em fezes bovinas foram inativados quando expostos a pH 2,5 e 3,0, mas permaneceram viáveis após oito horas em pH 4,0. Os valores de pH incluídos nesta pesquisa foram mais altos (5 a 7). Apesar desta variável apresentar efeito significativo individual sobre a resposta, esse efeito foi de baixa intensidade. Em um estudo realizado na Argentina com cepas de *E. coli* O157:H7 e não-O157:H7, o sorotipo O113:H21, isolado de hambúrguer, apresentou melhores condições de multiplicação em pH 5 a 7 (MOLINA; PARMA; SANZ, 2003). Neste trabalho a variação dos níveis de pH não exerceu influência no comportamento das cepas EC 784 e 1108/1, assim como da cepa EDL 933 da pesquisa anterior realizada pelo LHIMA (dados não publicados). Em relação à cepa de coliforme termotolerante nota-se um aumento da população em pH 6,0 com posterior queda em pH 7,0. A cepa DH5 α apresentou um aumento com a elevação dos níveis de pH. ALBASHAN (2009) observou que STEC O157:H7 sobreviveu em faixas de pH entre 3 a 9, sendo o pH 5 a melhor condição.

As cepas 1108/1 e de coliforme termotolerante apresentaram um aumento da população bacteriana com o aumento dos níveis de Aa e para as cepas EC 784 e DH5 α não houve diferenças na intensidade do efeito nos diferentes níveis de Aa avaliados. Contudo pesquisadores do LHIMA-UFF observaram maior efeito significativo sobre a sobrevivência de STEC O157:H7 (cepa EDL 933) em valor de Aa de 0,92 (dados ainda não publicados). HIRAMATSU et al (2005) no Japão observaram a capacidade de sobrevivência de STEC O157:H7 em alimentos desidratados (Aa 0,41 a 0,64), como chocolates, batatas chips e amendoins torrados. Outros autores observaram a maior habilidade de sobrevivência de STEC O157:H7 do que não-O157:H7, incluindo o sorotipo O113:H21, em superfícies de aço inoxidável sob condições secas (secagem de ar e umidade relativa de 70% a 12°C), onde algumas células bacterianas sobreviveram por mais de duas semanas. Estes autores concluíram desta forma, que este ambiente favorece a contaminação cruzada por STEC durante o processamento de alimentos (MORETTO et al., 2010).

Nesta pesquisa, as interações entre as variáveis, mesmo apresentando efeitos significativos, foram de baixa intensidade. Para a cepa de coliforme termotolerante apenas a interação entre pH e Aa foi significativa, porém de baixa intensidade. ALVES (2008) relatou que os valores de pH em 5,72, Aa de 0,97 e teor de cloretos em torno de 2,7%, não foram fatores efetivos para a inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em nenhuma etapa do processamento da carne soleada. Já LEE; KANG (2009), estudando a interação entre o tratamento térmico (calor), adição de sal e ácido em meio de cultura a fim de inibir *E. coli* O157:H7, observaram que a interação mais significativa foi entre a adição de sal e o calor (efeito sinérgico) e uma pequena redução de O157:H7 no tratamento com sal e ácido (efeito antagonista).

A interação entre as variáveis pH e temperatura (1Lby3L) exerceu baixo efeito significativo sobre a população bacteriana das cepas estudadas e para a cepa de coliforme termotolerante não foi significativo. ALEGRE et al., (2010) em um estudo com STEC O157:H7 inoculadas em duas variedades de maçãs minimamente processadas (pH, 3,3 e 4,1) observaram o aumento da população desta bactéria em temperatura de 10, 20 e 25°C., sendo as melhores condições em 20 e 25°C.

Os resultados apresentados pelos gráficos de superfície sugerem que as cepas EC 784 e 1108/1 podem apresentar habilidade de sobreviver em produtos lácteos como Q.M.F. (pH: 6,4; Aa 0,96), queijo prato (pH: 5,0; Aa: 0,97) e iogurte (pH: 5,0; Aa: 0,97) em um período de

4 a 5 dias na faixa de temperatura de armazenamento avaliada no estudo (8°C a 35°C) . A cepa de coliforme termotolerante manteve-se viável por mais tempo, em um período de 15 dias nessas mesmas condições. Com isso, os produtos lácteos citados podem ser sugeridos como veículos em potencial das cepas STEC O113:H21 avaliadas neste estudo, contudo outros fatores devem ser avaliados, como a microbiota do alimento.

É importante considerar que as bactérias ácido lácticas participam significativamente na microbiota de leite e derivados, contribuindo para o antagonismo entre microrganismos patogênicos (ORTOLANI, 2009). Essa atividade antagonista decorre pela competição por sítios de adesão e nutrientes, além da produção de substâncias antimicrobianas com características bactericida e bacteriostática, que podem criar um microambiente desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (CASTELLANO et al., 2008; ROUSE et al., 2007).

ALVES (2010) verificou que a adição do microrganismo *Lactobacillus acidophilus* no queijo minas frescal aumentou a segurança bacteriológica em relação a *E. coli* pela inibição do crescimento desta bactéria. Alguns autores observaram a inibição de O157:H7 em QMF onde bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus* possuíam a habilidade em produzir compostos antimicrobianos (CHIODA et al., 2007). Outros estudos, embora não englobem alimentos como o de OGAWA et al. (2001) são relevantes, onde constataram o antagonismo promovido por bactérias lácticas através da administração oral do probiótico *Lactobacillus casei*, devido a capacidade de produzir e tolerar uma concentração elevada de ácido láctico, permitindo assim a inibição de O157:H7.

Estudos futuros serão realizados a fim de avaliar a capacidade de recuperação de células viáveis de STEC O113:H21 em QMF e outros produtos lácteos, avaliando outros fatores como a microbiota e a composição do alimento neste contexto.

Espera-se que este trabalho sirva como incentivo à continuação de pesquisas sobre o tema, a fim de se obter cada vez mais informações acerca do comportamento de *E. coli* O113:H21, importante microrganismo presente no rebanho brasileiro e capaz de sobreviver em produtos lácteos, alimentos consumidos extensivamente pela população.

7 CONCLUSÕES

Em conformidade com os resultados obtidos e tendo em vista os objetivos estabelecidos para esta investigação, pode-se concluir que:

- ❖ A variável tempo apresentou efeito negativo, individual e/ou combinado, de maior relevância sobre todas as cepas estudadas.
- ❖ Os outros fatores, pH, Aa e temperatura, apresentaram efeito estatisticamente significativos, porém de baixo impacto sobre o comportamento de STEC O113:H21.
- ❖ As cepas pertencentes ao sorotipo O113:H21, nas condições avaliadas, não apresentam comportamento diferente da cepa de coliforme termotolerante.
- ❖ Produtos lácteos apresentam-se como veículo em potencial de STEC O113:H21.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBASHAN, M.M. Acid Tolerance of *Escherichia coli* O157: H7 Serotype and *Salmonella typhi* (A Group D Serotype) and Their Survival in Apple and Orange Juices. *World Journal of Medical Sciences*, 4 (1):33-40, 2009.

ALEGRE, I.; ABADIAS, M.; ANGUERA, M.; OLIVEIRA, M.; VIÑAS, I. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology*, 27:70-76, 2010.

ALMEIDA, M.V.M. Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) do sorotipo O157:H7 frente a pH, atividade de água, tempo e temperatura. *Monografia de conclusão de curso* – Instituto de Microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

ALVES, L.L. Avaliação físico-química e microbiológica da carne soleada do Pantanal. *Dissertação de Mestrado* - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2008.

ANDREATTA, E.; FERNANDES, A.M.; SANTOS, M.V.D.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M.C.; GIGANTE, M.L.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Qualidade do queijo minas frescal preparado com leite com diferentes qualidades de células somáticas. *Pesquisa Agropecuária Brasil*, 44 (3):320-326, 2009.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVEIRA, V.F.; BANAS, S.L.B.; SILVA, A.V.A.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira. Saúde e Produção Animal*, 2: 37-42, 2001a.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVEIRA, V.F.; BANAS, S.L.B.; SILVA, A.V.A.F. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira. Saúde e Produção Animal*, 1:10-14, 2001b.

ARAÚJO, V.S. ; PAGLIARES, V.A. ; QUEIROZ, M.L.; FREITAS-ALMEIDA; A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese comercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92:1172-1177, 2002.

BAGI, L.K.; BUCHANAN, R.L. Preservation of *Listeria monocytogenes* and other pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Letter Applied Microbiology*, 17:37-39, 1993.

BASTIAN, S.N.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 149:457-472, 1998.

BRASIL. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Queijos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Resolução n° 5 de 13/11/2000 – Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC n° 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC nº 275, de 21 de Outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira. Secretaria de Atenção à Saúde, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: jan. 2010.

BERG R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiology*, 4:430-435, 1996.

BERGANIMI, A., M., M.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B., E., C. Prevalence and characteristics of Shiga toxigen-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:553-556, 2007.

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

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEURTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestical animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2483-2488, 1993.

BEUTIN L.; MIKO A.; KRAUSE G.; PRIES K.; HABY S.; STEEGE K.; ALBRECHT N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from

food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 2007 Aug;73(15):4769-75. Epub 2007 Jun 8.

BIRD, B.R.; FORRESTER, F.T. Basic laboratory techniques in cell culture. 175p. U.S. Depart. Hlth. Human Services. *CDC*, Atlanta, 1981.

BLANCO, J.; BLANCO, M., J.E.; MORA, A.; GONZALEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; ALONSO, M.P.; COIRA, A.; RODRÍQUEZ, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; USERA, M.A. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine*, Maywood, New Jersey, USA, 228 (4): 345-351, 2003.

BLATTNER, F.R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C.A.; PERNA, N.T.; RILEY, V. B.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J.D.; RODE, C.K.; MAYHEW, G.F.; GREGOR, J.; DAVIS, N.W.; KIRKPATRICK, H.A.; GOEDEN, M.A.; ROSE, D.J.; YING SHAO, B.M. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*: Vol. 277. no. 5331, p. 1453 – 1462, 1997. DOI: 10.1126/Science.277.5331.1453

BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J. B.; JOHNSON, R. P.; GYLES, C. L. Associations between virulence factors of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 497-503, 1999.

BOLINI, H. M. A.; MORAES, P. *Tese mostra que análise sensorial incrementaria produção de iogurte*. *Jornal da Unicamp*, ed. 253, 2004., p. 11.

BONNET, R.; SOUWEINE, B.; GAUTHIER, G.; RICH, C.; LIVRELLI, V.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Non-O157 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:1777–1780, 1998.

BOULOS, M.E.M.S. Segurança alimentar: uma preocupação – questão de atualizar e viabilizar informação. *Nutrição em Pauta*. 1999, 23 p.

BRANT, L.M.F; FONSECA, L.M; SILVA, M,C,C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de. Medicina Veterinária e Zootecnia* 59(6):1570-1574, 2007.

BRETT, K.N.; HORNITZKY, M.M.; BETTELHEINN, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess *stx2-EDL933* and/or *stx2vhb* subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:2716-2722, 2003.

BROWN-BRANDL, T.M.; BERRY, E.D.; WELLS, J.E.; ARTHUR, T.M.; NIENABER, J.A. Impacts of individual animal response to heat and handling stresses on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding by feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(7):855-864, 2009.

BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. The effect of incubation temperature , initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 9:185-196, 1992.

BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Technology*, 51:69-76, 1997.

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. *Arquivo Brasileiro de. Medicina Veterinária e. Zootecnia*, 4: 54-320, 2002.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H. J.; BLATTNER, F. R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research*, 26: 4196-4204, 1998.

BUZBY, J.; ROBERTS, T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology*, 136:1851-1962, 2009.

CALDERWOOD, S.B.; ACHESON, D.W.K.; KEUSCH, G.T.; BARRETT, T.J.; GRIFFIN, P.M.; STROCKBINE, N.A.; SWAMIMATHAN, B.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; KAPLAN, B.S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A.D.; OBRIG, T.G.; TAKEDA, Y.; TARR, P.I.; WACHSMUTH, I.K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*, 62:118-119, 1996.

CAMPOS HIDALGO, M.R.; KIPNIS, A.; BORGES PORFÍRIO, M.C.D.; VIEIRA, C.A.; BORGES, L.; SANTOS, P.; SERAFIN, A. Phenotypic characterization by antibiogram of *Escherichia coli* strains isolated from handlers, raw milk and "Minas Frescal" cheese samples in a dairy process plant in Goiás, Brazil, *Ciência Rural* v.36 n.4, p.1221-1227, 2006.

CANTARELLI, V.; NAGAYAMA, K.; TAKAHASHI, A.; HONDA, T.; CAUDURO, P.F.; DIAS CAG, MAZZARI, A & BRODT T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O9:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:266-270, 2000.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Researches*, 36: 289-311, 2005.

CARVALHO, J.D.G. Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

CASTANIE-CORNET, M. P.T. A.; PENFOUND, D.; SMITH, J. F.; ELLIOTT, AND J. W. FOSTER. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181:3525-3535, 1999.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79:483-499, 2008.

CDSC. *Escherichia coli* O157:H7 infection and unpasteurized cream in England. Communicable Disease Surveillance Centre. Commun. Eurosurveillance Wkly. 2:981022, 1998.

CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds: Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality, Winconsin, v. 49, p. 911-913, 2000.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of Bacterial and Mycotic Disease. Disease Information. Diarrheogenic *Escherichia coli* [on line]. 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mcidod/dbmd/diseaseinfo/diarrecoli-t.html>>. Acesso em 15 jan. 2010.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; NISHIMURA, L. S.; IRINO, K.; VAZ, T. M.; DE CASTRO, A. F.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. C. Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiology Letters*, 259 (2): 234-9, 2006.

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

CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro state, Brazilian *Veterinary Microbiology*, 70: 111-21, 1999.

CERQUEIRA, A. M. F. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga: prevalência no reservatório animal, marcadores de virulência e análise da estrutura clonal. *Tese (Doutorado)*, Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP. 2000.

CHATTERJEE, S.; BERTRAM, P. Regression analysis. New York: John Wiley, Sons, INC, 1991.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo Minas Frescal por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, v.37 n.2, p.583-585, 2007.

CHIUEH, L.F.; LIU, F.; SHIH, D.Y. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feed and raw milk of domestic cattle and sheep. *Journal of Food Drug Analysis*, 10:39-46. 2002.

CHYE, F.Y. et al. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*. 21 (2): 535-541, 2004.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3462-3465, 1996.

COELHO, F.J.O.; QUEVEDO, P.S.; MENIN, A.; TIMM, C.D. Avaliação do prazo de validade do iogurte. *Ciência Animal Brasileira*, v.10 n.4, p.1155-1160, 2009.

COLDEWY, S.M.; HARTMANN, M.; SCHMIDT, D. S.; ENGELKING, U.; UKENA, S. N.; GUNZER, F. Impact of the *rpoS* genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 7:21, 2007.

DAIRY COUNCIL ORGANIZATION – Lactose Intolerance revisited. 2008. Vol 79, nº 5. Disponível em: <www.nationaldairycouncil.org>. Acesso em 10 dez. 2009.

DLAMINI, B., C.; BUYS, E., M. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiology*, 26:58-64, 2009.

DOYLE, M. ; PADHYE, V. *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. (Editor), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 236-282, 1989.

DOYLE, M., P. et al. *E. Coli* O157 :H7. In : DOYLE, M., P. et al. (Eds) *Food Microbiology – Fundamentals and frontiers*. Washington, DC : ASM, 171-179, 1997.

DYTOC, M. T.; ISMAILI, A.; PHILPOTT, D. J.; SONI, R.; BRUNTON, J. L; SHERMAN, P. M. Distinct binding poperties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infection and Immunity*, 62: 3494-3505, 1994.

FARAH, S., M.; S., S.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; IRINO, K.; DA SILVA, L. R.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PIGGATO, C. P.; FADEL-PICHETH, C. M. T. Phenotyping e genotyping traits of Shiga toxing-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (6):607-612, 2007.

FERREIRA, L.D. Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado. *Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Engenharia de Alimentos*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2004.

FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; MILHOMEM, A.M., et al. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food and Protection*, v.56, p.62-65, 1993.

FURTADO, M.M. A arte e a ciência do Queijo. 2ª;ed. São Paulo: Globo, 1990. 295p.

FOSTER, J.W. Microbial responses to acid stress. In: *Bacterial Stress Responses*. Storz G and HENGGE-ARONIS R (ed). Washington, DC: *ASM Press*, 99–115, 2000.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frechal tipo toscana. *Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária*. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2002.

FRANKEL, G.; PHILLIP, A. D.; ROSINSHINE, I.; DONGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 30: 911-921, 1998.

FREMAUX, B.; RAYNAUD, S.; BEUTIN, L.; ROZAND, C. V. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Veterinary Microbiology*, 117:180-191, 2006.

GEERAERD, A.H.; VALDRAMIDIS, V.P.; DEVLIEGHERE, F. BERNAERT, H.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J.F. Development of a novel approach of secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiology knowledge in black box polynomial modeling. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 229-244, 2004.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F. CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. *Higiene Alimentar*, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.

GOLDWATER, P. N.; GILES, N.; BETTELHEIM, K. A. An unusual case of microangiopathic haemolytic anaemia associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21 infection, a verocytotoxin-2/shiga toxin-2 producing serotype. *Journal of Infection* 37: 302-4, 1998.

GONZALEZ, A. G. M., ROSA, A. C. P., ANDRADE, J. R. C.; TIBANA A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food and Microbiology*, 17: 321-328, 2000.

GONZALEZ, A.G.M., Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

GORDEN, J., SMALL, P.L. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity* 61(1): 364-367, 1993.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cow's milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*, 6:655-660, 2002.

GUDONG, W.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2567-2570, 1996.

GUERREIRO, P., K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal and Science* .85:E45-E62, 2007.

GRIFFIN, P. M. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. In KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. p.15-22., *ASM Press*, Washington D.C. 1998.

GUIMARÃES, C.M. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Escherichia coli* *rfb*_{O113-} positivas isoladas de bovinos sadios em Miracema, RJ. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2009.

GUTH, B.E.C., SOUZA, R.L., VAZ, T.M.I. & IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, *Emerging Infections Diseases* 8: 535-536, 2002.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity island and the evolution of microbes. . *Annual Review of Microbiology*, 54: 641-679, 2000.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology and Reviews*, 66:373–395, 2002.

HENGGE-ARONIS, R.; LANGE, R.; HENNEBERG, N.; FISCHER, D. Osmotic regulation of *rpoS* – dependent genes in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 175:259-265, 1993.

HENGGE-ARONIS, R.; FISCHER, D. Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 6:1877– 1886, 1992.

HIRAMATSU, R.; MATSUMOTO, M.; SAKAE, K.; MIYAZAKI Y. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6657-6663, 2005.

HOFFMAN, F.L.; SILVA, J.V. DA; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica e queijos tipo “Minas frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 96, p. 69-76, mai. 2002.

HOHENDORFF, V. C,G,; SANTOS, D. Produção de queijos. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, 2006.

HONISH, L.; PREDY, G.; HISLOP, N.; CHUI, L.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TROTTIER, L.; KREPLIN, C.; ZAZULAK, I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*, 96(3):182-4, 2005.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 88:450–465, 2005.

IBANEZ-RUIZ, M. V.; ROBBE-SAULE, D.; HERMANT, S.; LABRUDE, AND F. NOREL. Identification of RpoS (S)-regulated genes in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 182:5749–5756, 2000.

(ICMSF), International Commission on Microbiological Specifications for Foods Ecologia Microbiana de los Alimentos: Productos alimentícios, v. 2, Ed. Acribia S.A. Zaragoza, 1980, p. 678-698.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*, 1ª versão eletrônica. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microbial ecology of foods factors affecting life and death of microorganisms. *Academic Press: London*, V.1, 1980.

IRINO, K.; KATO, M. A.; VAZ, T. M.; RAMOS, I.; SOUZA, M. A.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; GUTH, E. B. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 105: 29-36, 2005.

IRINO, K., VAZ, T.M.I., KATO.A.M.F., NAVES, Z.V.F., LARA, R.R., MARCO, M.E.C., ROCHA, M.M.M., MOREIRA, T.P., GOMES, T.AT. & GUTH, B.E.C. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerge Infection Disease*, 8:446-447, 2002.

JENKINS, C.; PERRY, N. T.; CHEASTY, T.; SHAW, D. J.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G. J.; SMITH, H. R.; PATON, A. W.; PATON, J. C. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Jornal of Clinical and Microbiology*, 41: 1775-78, 2003.

JOAQUIM, R. M. Epidemiologia de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em bovinos: avaliação de fatores determinantes da ocorrência e estudo da dinâmica populacional. *Dissertação (Mestrado)* – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2002.

JOHANNES, J.; RÖMER, W. Shiga-toxins – from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n2/abs/nrmicro2279.html>> Acesso em: 21 dez. 2009.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2:15-38, 1989.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140, 2004.

KESKIMÄKI, M.; IKÄHEIMO, R.; KÄRKKÄINEN, P.; SCHEUTZ, F.; RATINER, Y.; PUOHINIEMI, R.; SIITONEN, A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome. *Clinical and Infection Diseases*, 24: 1278-79, 1997.

KEUSCH, G. T.; ACHESON, D. W. K.; MARCHANT, C. & MCIVER, J. Toxoidbased active and passive immunization to prevent and/or modulate hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Kaper, J. B. & O'brien, A. D. (Editors), *Escherichia coli* O157-H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, *ASM Press*, Washington, D.C. p. 409-418, 1998.

KOLTER, R. Growth in studying the cessation of growth. *Journal of Bacteriology*, 181:697–699, 1999.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I. & STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18: 775-779, 1977.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular and Microbiology*, 5:49–59, 1991.

LARGE, T.M.; WALK, S.T.; WHITTAM, T.S. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2493–2500, 2005.

LEBLANC, J. L. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 29:277-296, 2003.

LEE, S.Y.; KANG, D.H. Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. *Food Control* 20:1006–1012, 2009.

LEKKAS, C.; KAKOURI, A.; PALEOLOGOS, E.; VOUTSINAS, L.P.; KONTOMINAS, M.G.; SAMELIS, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. *Food Microbiology*, 23:268-276, 2006.

LEISTNER, L. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable products and intermediate moisture foods types. In: MULTON, J. L. Ed. *Properties of water in foods*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 309-329.

LEUSCHNER, G.K.R.; BOUGHTFLOWER, P.M. Laboratory: scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovars Thyphimurium, Enteritidis, and Dublin. *Journal of Food and Protection*, 65:508-514, 2002.

LEOTTA, G. A.; DEZA, N.; ORIGLIA, J.; TOMA, C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKYE, E.; IYODA, S.; SOSA-ESTANI, S.; RIVAS, M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Veterinary and Microbiology*, 118:151-157, 2006.

LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Infection and Disease*, 156:175-182, 1987.

LEWIS, M.J. Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesados. Zaragoza: Acribia, 1993 494 p.

LIN, J.; LEE, I. S.; FREY, J.; SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. W. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177:4097–4104, 1995.

LIN, J., SMITH, M. P.; CHAPIN, K. C.; BAIK, H. S.; BENNETT, G. N.; FOSTER, J. W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3094–3100, 1996.

LIRA, W. M.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *Journal of Applied and Microbiology*, 97: 861-866, 2004.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, v.31, n.6 *Rural*, São Paulo. 2001.

LOUKIADIS, E., KEROUREDAN, M.; BEUTIN, L.; OSWALD, E.; BRUGERE, H. Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:3245–3251, 2006.

LUCK, N. S.; BENNETT-WOOD, V.; POON, R.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement–negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 73: 3063-3071, 2005.

MAJALIJA, S.; SEGAL, H.; EJOBI, F.; ELISHA, B., G. Shiga Toxing gene-containing *Escherichia coli* from catle and diarrheic children in the pastoral systems of southwestern Uganda. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2008, p. 352–354.

MAULE, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symposium. Series Society for Applied Microbiology*, 29:71–78, 2000.

MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Avaliação das características físico-químicas do queijo Minas frescal produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. Pirassununga: FZEA/USP, 2004. 15 p. (Iniciação Científica).

MAWSON, A.J. Bioconversion of whey utilization and waste abatemente. *Bioresource Technology*, v. 47, p. 195-203, 1994.

MELO, M.M.; SANTOS, N.D. Comportamento de *Escherichia coli* O157:H7 frente a alguns fatores que controlam o desenvolvimento bacteriano. *Monografia de Conclusão de Curso – Faculdade de Nutrição*. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2008.

MELTON, C. A.; O'BRIEN, A. D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper JB & O'Brien AD (eds). *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 121-128, 1998.

MILLER, L. G.; KASPAR, C. W. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food and Protection*, 57:460–464, 1994.

MITSUOKA T. Intestinal flora and aging. *Revista de Nutrição*.50:438-446,1992.

MICHELI, E. S.; PAULO, C. M. P. Microbiota intestinal de indivíduos que sofreram acidente ocupacional com materiais biológicos e que realizaram profilaxia anti retroviral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(6): 653-656, nov-dez, 2007.

MODLER, W., H. Milk Processing. *Food proteins::processing applications*. In: NAKAI, S.

MODLER, H.W. (Ed.) Canada: Wiley-VCH, 2000. 88 p.

MOLINA, P.M.; PARMA, A., E.; SANZ, M.E. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. *BMC Microbiology* 3:17, 2003.

MOREIRA, C. N.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; RODRIGUES, D. P.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary and Microbiology*, 93: 179-183, 2003.

MORETTO, T.; HEIR, E.; MO, K.R.; HABIMANA, O.; ABDELGANI, A.; LANGSRUD, S. Factors affecting survival of Shigatoxing-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. *Int. Journal of Food and Microbiology*, 138: 71-77, 2010.

MORGAN, C.P.; NEWMAN, D.N.; HUTCHINSON, A.M.; WALKER, B.; F. MAJID. Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt, *Epidemiology and Infection*, 111:181–187, 1993.

MULVEY, M. R. J.; SWITALA, A.; BORYS, AND P. C. LOEWEN. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172:6713–6720, 1990.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical and Microbiology Review*, 11: 142-201, 1998.

NAKASHIMA, S.M.K. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3:4-51, 2000.

NDC - National Dairy Council (Conselho Nacional de Laticínios - EUA). Disponível em: <<http://www.lacteabrasil.org.br/pagina.asp?idS=21&idN=271>>. Acesso em: 05/02/2010.

NERO, L. A. ; DE MATOS, M.R.; BELOTI, V.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J.P.A.N., DE ANDRADE, N.J., SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian. Journal of Microbiology*, 35:211-215, 2004.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3 ed. Editora da UNICAMP, Campinas-SP, 2007, 480 p.

NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. Artigo Técnico. *Rev. Leite e Derivados*, nº 10, p. 50-54, 1993.

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

NOTLEY-MCROBB, L.; KING, T.; FERENCI, T. *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J. Bacteriol.* 184:806–811, 2002.

NYSTROM, T. Stationary-phase physiology. . *Annual Review of Microbiology* ,58:161–181, 2004.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 40:675-683, 1983.

OGAWAM, M.; SHIMIZU,K.; NOMOTO, K.; TAKAHASHI, M.; WATANUKI,M.; TANAKA, R.; TANAKA, T.; HAMABATA, T; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infection and immunity*. 69 (2): 1101-1108, 2001.

OKITA, T. W.; RODRIGUEZ, R. L.; PREISS, J. Biosynthesis of bacterial glycogen: cloning of the glycogen biosynthetic enzyme structural genes of *Escherichia coli*. *Journal of Biology Chemistry*, 256:6944-6952,1981.

OLIVEIRA, J.S. Queijo: fundamentos tecnológicos. *Ciência e Tecnologia*, 2ed., Editora da UNICAMP, Campinas,1986, 146 p.

OMBUI, J.N.; DABURIA, H.F.A. MACHARIA, J.K.NDUHIA, G. Coliform counts and *Escherichia coli* in raw commercial Milk from dairy farmers in Kaimbu District, Kenya. *East African Medicine Journal*, 71:635-639., 1994.

ORTOLANI, M.B.T. Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. *Dissertação (Mestrado)* – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. Rapid procedure of detection enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2693-2698. 1991.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb0111, and rfb0157. *Journal of Clinical and Microbiology*, 36: 598-602, 1998a.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *Journal of Clinical and Microbiology*, 37: 3362-65, 1999.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODDROW, M. C.; PATON, J. C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*, 69:6999-7009, 2001

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

PEREIRA, A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

PIGATTO, C. P.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; COMARELLA L.; IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; FARAH, S. M. S. S.; WARTH, J. F.; FADEL-PICHET, C. M. T. Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxigen-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 54:588-593, 2008.

PFLANZER JR, S.B.; CRUZ, A.G.; ZOLLNER, S. S.; ARRUDA, P. M.; SILVA, R.; SOARES, M. M.; FERNANDES, V.S. Hábitos e práticas do consumidor de queijo. V Simpósio Internacional ABRAPA de Inocuidade de Alimentos, 2006, 81 p.

PINTO, K. Venda de produtos lácteos. Disponível em: <<http://www.pack.com.br/blog/index.php/2009/12/17/venda-de-produtos-lacteos-cresce-em-2009-e-manter-ritmo-em-2010-diz-pesquisa>>. Acesso em: 15/02/2010.

PRESSER, K. A., RATKOWSKY, D. A. & ROSS, T. Modelling the growth limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, June; 63(6): 2355–2360, 1998

PRICE, S. B.; WRIGHT, J. C.; DEGRAVES, F. J.; CASTANIE-CORNET, M. P.; FOSTER, AND J. W. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:4792–4799, 2004.

PRICE, S. B.; CHENG, C. M.; KASPAR, C. W.; WRIGHT, J. C.; DEGRAVES, F. J.; PENFOUND, T. A.; CASTANIE-CORNET, M. P.; FOSTER, J. W. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:632–637, 2000.

RAJKNOWSKI, K.T.; MARMER, B.S. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *Journal of Food and Protection*, 58:1307-1317, 1995.

REID, T.M.S.A. Case study of cheese associated *E. coli* O157:H7 outbreaks. *Food and Nutrition*, 201-212, 2001.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *New Engl. Journal of Medicine*, 308, 681–685, 1983.

RIORDAN, D. C.; G. DUFFY, J. J.; SHERIDAN, R. C.; WHITING, I. S.; BLAIR; MCDOWELL, D. A. Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1726–1729, 2000.

RIOS, M., PRADO, V., TRUCKSIS, M., ARELLANO, C., BORIE, C., ALEXANDRE, M., FICA, LEVINE, M.M. Clonal Diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical and Microbiology*, 37: 778-781, 1999.

RIVAS, M.; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J.; CALETTI, M.G.; VALLÉS, P.; ROLDÁN, C.D.; BALBI, L.; MOLLAR, M.C.M.; AMOEDO, D.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; HOEKSTRA, R.M.; MEAD, P.; GRIFFIN, P.M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. *Emerge Infection and Disease*, 14 (5): 763–771, 2008.

ROBINS-BROWNER, R.M.; ELLIOTT, E.; DESMARCHELIER, P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Austrália. p.66-72. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Kaper, J.B. & O'Brien, A.D. (ed). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1998.

ROCHA, J.S; BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Conditions of productions and distribution of minas fresh cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,. v.58, n.2, p.263-272, 2006.

RADOSTISTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCUFF, K. W.; Clínica Veterinária – Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2002.

ROSA, V. P. Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal. *Dissertação* (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

ROSS, T.; RATKOWSKY, D.A.; MELLEFONT, L.A.; MCMEEKIN, T.A. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 82:33-43, 2003.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923, 2007.

SALAK-JOHNSON, J.L.; MCGLONE, J.J. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science* 85 (E Suppl):E81-E88. 2007.

SANGALETTI, N.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V.; ISEPON, J. S. dos; SANTOS, P. A.dos; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. *Higiene Alimentar*, V.17, 89, 2003, 2007.

SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2364-2367, 1996.

SEMENOV, A.V.; VAN BRUGGEN., A. H.C.; OVERBEEK, L.V.; TERMORSHUIZEN, A.J.; SEMENOV, A.M. Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology and Ecology*, v.60,p. 419–428, 2007.

SHEEN, S.; HWANG, C.A. Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157: H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Journal of Food Science and Technology*, 27(1): 37-43, 2009.

SILVA, J.A. Tópicos da tecnologia de alimentos. São Paulo:Varela, 2000. 231p.

SILVA JÚNIOR, E. A. Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SILVA, A. R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em nectar de manga, frente a pH e T. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas, 2006, 232p.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L.R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras. V.27, n.6, p.1340-1347, nov./dez., 2003.

SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. W. pH-regulated genes and survival at acidic pH, p. 1539–1549. In F. C. NEIDHARDT, R. CURTISS III, J. L. INGRAHAM, E. C. C. LIN, K. B. LOW, B. MAGASANIK, W. S REZNIKOFF, M. RILEY, M. SCHAECHTER, AND H. E. UMBARGER (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2. ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C., 1996.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *Journal of Bacteriology*, 176:1729–1737, 1994.

SOUSA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*, v.9, n.1, p. 83-88, jan./jun. 2006.

SQUILASSI, M.G. Leite e bebida láctea. Disponível em: < <http://www.laticinio.net>>. Acesso em: 05/02/2010.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, R.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; DANUSER, J.; BEAUTIN, L. Prevalence and characteristics of Shiga toxing-producing *Escherichia coli* in swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, 91:2561-2565, 2008.

TAMINE, A Y.; ROBSON, R. K. *Yogurte: ciência e tecnologia*. Ed. Zaragoza, Acribia, 1991, 367 p.

TAUXE, R.V.; DOYLE, M.P.; KUCHENMULLER, T.; SCHLUNDT, J; STEIN, C.E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.014, 2009.

TETRA PAK DAIRY INDEX. Uma fonte semestral de notícias e de informações sobre a indústria de laticínios – Focos nos mercados emergentes. Edição 1. Junho de 2009.

TIMM, C., D.; CONCEIÇÃO, F., R.; MENIN, A.; DA CONCEIÇÃO, R., C., S.; DELLAGOSTIN, O., A.; ALEIXO, J., A., G. Prevalence of Shiga toxing-producing in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. *Ciência Animal Brasileira*, 10 (1): 641-649, 2009.

TOIVANEN P.; VAAHTOVUO, J.; EEROLA, E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infection and Immunity* 69: 2372-2377, 2001.

TOLEDO, J.C. Gestão de qualidade na agroindústria. In: Gestão Agroindustrial. 2.ed. São Paulo. Atlas, 2001, v.1, p. 465-517.

TORTORA, G.I.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*, 6 ed. Porto Alegre: Art Med, 2000.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M.F., GOMES; M. J. P.; Irino, K.; Guth, B. E. C.; Andrade, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*, 119: 358-65, 2007.

TRONCO, V. M. Manual para a inspeção da qualidade do leite. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 166 p., 2003.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Escherichia coli*. In:_____. Foodborne pathogens: an illustrated text. *Marison Publishing*, 1996, cap. 6, 501 p.

VAZ, T.M.; IRINO, K.; KATO, M.A.; DIAS, A.M.; GOMES, T.A; MEDEIROS, M.I.; ROCHA, M.M.; GUTH, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical and Microbiology*, 42:902-905, 2004.

YANO, T.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; GARCIA, M.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerro com diarreia. *Annual Review of Microbiology*, 17: 339-341, 1986.

WALSTRA, P. et al. Dairy Technology. Principles of milk properties and processes. 2001.

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

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V. F.; HENGGE, R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*. 187:1591–1603, 2005.

WERBER, D.; BEUTIN, L.; PICHNER, R.; STARK, K.; FRUTH, A. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serogroups in Food and Patients, Germany. *Emerge Infection and Disease* 14(11): 1803–1806, 2008.

WHITTAM, T. S.; WOLFE, M. L.; WACHSMUTH, I. K.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; WILSON, R. A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infection and Immunity* 61:1619-1629, 1993.

WHO. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1998.

ZAMBRANO, M. M.; SIEGELE, D. A.; ALMIRON, M.; A.; KOLTER, R.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food and Protection*, 57:780–783, 1994.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)