

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE BOTUCATU

&

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA DE
SHIGA EM MEIOS ÁCIDOS**

Adriana Lucatelli

Orientadora: Professora Dra. Mariza Landgraf

Supervisora: Professora Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial
para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas pelo Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu.

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Lucatelli, Adriana.

Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em meios ácidos / Adriana Lucatelli. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Mariza Landgraf

1. *Escherichia coli* 2. Shiga-toxina 3. Bactéria

Palavras-chave: Estresse ácido; polpa de fruta; STEC, Toxina de Shiga

COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE TOXINA DE SHIGA EM MEIOS ÁCIDOS

Adriana Lucatelli^{1,2} & Mariza Landgraf¹

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ²Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que habita o intestino de animais de sangue quente, com 90% sendo comensais para o ser humano e 10% patogênicas. Quando presente em alimentos esse grupo é considerado um bom indicador higiênico-sanitário de alimentos. Em alimentos, a cepa patogênica mais estudada é *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) O157:H7. Entretanto, muitos casos vêm ocorrendo em todo o mundo devido a cepas patogênicas não O157, como O103, O111, O145 e O26. As STECs são responsáveis por desde uma simples diarreia até diarreia sanguinolenta que pode evoluir ainda para síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica, que podem ocasionar danos crônicos como falência renal. A transmissão destas cepas se deve a carnes mal cozidas, leites e derivados não pasteurizados, água e vegetais contaminados. Uma característica interessante de *E. coli* O157:H7 é o seu mecanismo de resistência ao estresse ácido – ácido tolerância – de modo que os alimentos ácidos não podem mais ser considerados seguros contra tais organismos. A fim de ampliar o conhecimento acerca das cepas não O157 e dos mecanismos de ácido resistência, este trabalho teve por objetivo verificar o comportamento de linhagens de STEC não O157:H7 submetidas às condições de estresse de baixo pH utilizando para tanto meios de cultura acidificados e polpas de frutas como matriz alimentar. Constatou-se que quando mantidas em condições-controle e as ácido-adaptadas mantêm populações da ordem de 2 a 3 log UFC/mL quando em polpas de frutas sabor cajá (pH 2,3) e tamarindo (pH 2,3) armazenadas a 4 °C por até 30 dias.

Palavras – Chave: STEC, toxina de Shiga, estresse ácido, polpa de fruta.

Autor correspondente: Landgraf, M. Universidade de São Paulo – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Avenida Professor Lineu Prestes, 580 – CEP: 05508-900 São Paulo, SP – Brasil. Tel. (11) 3091-2191 ou (11) 3091-2199. E-mail: landgraf@usp.br.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo pertencente à família Enterobacteriaceae, com 90% das cepas sendo comensais e 10% patogênicas para o ser humano. Esse microrganismo faz parte da microbiota intestinal de muitos vertebrados e, portanto, é considerado um indicador confiável da qualidade higiênico-sanitária de água e alimentos. (5, 42). Sua temperatura ótima varia entre 30 e 37 °C e seu pH ótimo entre 7,2 e 7,5 (14).

E. coli compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados com as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, antígenos O, K e H, sendo que nem todas as linhagens de *E. coli* apresentam os 3 tipos de antígenos simultaneamente (14). As cepas patogênicas são classificadas de acordo com seu mecanismo de patogenicidade em *E. coli* enteropatogênica – EPEC - (32, 43), *E. coli* enteroinvasoras – EIEC - (30, 32), *E. coli* enterotoxigênicas – ETEC - (32, 34), *E. coli* enteroagregativas – EAEC (12), as que causam infecções extra-intestinais - ExPEC - (16) e *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) ou de verotoxinas (VTEC) (22, 32).

O habitat de STEC ou de O157 é o intestino de diversas espécies de animais domésticos e selvagens, sendo os ruminantes os principais reservatórios (27).

As linhagens de STEC podem causar diarreia não sanguinolenta, diarreia sanguinolenta que pode evoluir para colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombocitopênica trombótica, ocasionando problemas crônicos como falência renal (3, 19, 21, 46, 48).

A transmissão deste microrganismo ao ser humano ocorre através do consumo de água (7, 46) ou alimentos contaminados (21, 46), tais como carnes mal passadas (3, 28, 47), leites e derivados não pasteurizados (3, 28), sucos de vegetais, entre eles de maçã e cidra, além de espinafre, couve-de-bruxelas, repolho, tomates e brotos de vegetais (3, 47, 50). Alimentos processados como iogurtes, queijos e linguiças fermentadas também já foram incriminados em surtos de doenças causadas por *E. coli* O157:H7 (40). A infecção também pode ser adquirida pela transmissão de pessoa

para pessoa (3) ou de animais infectados (ou seus ambientes) para seres humanos (3, 7) sendo que, em alguns casos, o número de células necessárias para o desenvolvimento da infecção é muito baixo - de 1 a 10 células de *E. coli* O157:H7 (5, 9, 26).

O cozimento correto de carnes e a pasteurização de leites e seus derivados são medidas de proteção importantes, mas não suficientes por si mesmas (48). A contaminação dos alimentos pode ocorrer durante ou após o abate de animais, no seu processamento, transporte, armazenamento ou pela contaminação cruzada com bactérias encontradas no ambiente, superfícies, utensílios e equipamentos (39).

A patogênese da infecção causada por STECs em humanos depende de fatores de virulência bacterianos e de fatores do hospedeiro (25). A patogenicidade de STEC é mediada principalmente por citotoxinas - potentes inibidoras da síntese protéica e chamadas de toxinas de Shiga (Stx₁, Stx₂ e suas variantes) - codificadas por *stx*₁ e *stx*₂ e por produtos da ilha de patogenicidade do *locus* do *effacement* do enterócito (5, 33, 36, 47). As toxinas Stx₁ e Stx₂ são produzidas no intestino grosso e translocadas através do epitélio intestinal para a circulação sanguínea, onde inibem a síntese protéica e, portanto, causam necrose ou apoptose das células endoteliais vasculares (21). Tais toxinas também podem modular a resposta imune inata de células humanas e favorecer a fixação da bactéria ao epitélio intestinal (21).

O mecanismo central da patogênese de EHEC é uma lesão chamada *attaching and effacing* (A/E), que é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais e pela íntima fixação da bactéria à membrana epitelial do hospedeiro através de “pedestais” de agrupamentos protéicos densos (actina polarizada) e outros elementos do citoesqueleto que se protraem da membrana apical (11, 15).

Mais de 83% dos casos de síndrome hemolítica urêmica em crianças ocorrem após infecções por STEC (18). Nos Estados Unidos, de 80 a 86% das infecções causadas por STEC envolvem *E. coli* O157:H7 (4). Em muitos países, incluindo Brasil, Austrália, Chile, Argentina e países europeus, sorotipos de STEC não O157: H7 estão associados com a maioria dos casos de síndrome hemolítica urêmica (22, 24). Os mais comumente associados às doenças humanas incluem O26: H11, O103: H2 e O111: NM (17, 24).

A importância do suco gástrico para o controle de infecções veiculadas por alimentos é bem conhecida. Alguns estudos investigaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em alimentos ácidos (2, 10, 29, 38). Entretanto, pouco se sabe a respeito das cepas de *E. coli* não-O157:H7, que têm emergido como um patógeno veiculado por alimentos contaminados (21).

Acreditava-se que situações de estresse como baixo pH e baixa atividade água eliminariam tais bactérias dos alimentos (8, 35, 44). Porém, após surtos envolvendo lingüiças e *E. coli* O157:H7 constatou-se um aumento nos estudos sobre a sensibilidade desse microrganismo frente a tais métodos de controle (23).

Conner & Kotrola (10) constataram a sobrevivência do microrganismo por até 56 dias em $\text{pH} \geq 4,0$ usando TSB acidificado com diversos ácidos. A multiplicação de *E. coli* O157:H7 foi observada em pH 4,5 quando adicionado de HCl mas não quando se empregou ácido láctico para atingir pH de 4,6 (20).

Estudo realizado por Marques *et al.* (29) mostrou haver diferenças entre cepas de *E. coli* O157:H7 previamente adaptadas a condições ácidas e aquelas não adaptadas quando inoculadas em polpas de frutas, com pH entre 2,51 e 3,26, reconstituídas e armazenadas a 4 °C. Os resultados mostraram que as células adaptadas sobrevivem por longos períodos (até 30 dias) quando armazenadas a 4 °C, dependendo não só do pH do meio mas também da viscosidade da polpa. Segundo Arnold & Kaspar (2), a tolerância de *E. coli* O157:H7 a meios ácidos é otimizada em baixas temperaturas.

Poucos estudos relatam a sobrevivência de *E. coli* O157: H7 em meios ácidos, como em polpas ou sucos de frutas (29, 38) e menos ainda se sabe sobre a sobrevivência de STECs pertencentes a sorogrupos não O157, cujo envolvimento com doenças transmitidas por alimentos está aumentando (21).

Desta forma, considerando a importância das linhagens de *E. coli* não O157:H7 para a saúde pública associada aos poucos estudos a respeito da sobrevivência destes organismos submetidos a condições de estresse, estudos como o aqui relatado poderão fornecer informações importantes para a compreensão destes patógenos frente às situações já citadas.

OBJETIVOS

Diante das lacunas na literatura acerca da sobrevivência de linhagens de STEC não pertencentes ao sorotipo O157:H7 em meios ácidos, os objetivos deste trabalho foram

- Verificar o comportamento de linhagens de STEC não O157:H7 submetidas às condições de estresse de baixo pH utilizando como veículo diferentes tipos de polpas de frutas reconstituídas em sucos;
- Verificar o comportamento dessas linhagens nas condições de estresse - pré adaptadas a pH 5 - e verificar a influência do pH no comportamento das linhagens

comparando a inoculação em polpas com a inoculação em caldo tripticase soja com pH semelhante ao da polpa.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Microorganismos: as cepas de STEC dos sorogrupos O103, O111 e O26 foram gentilmente cedidas pela Dra. Beatriz E. Guth, da UNIFESP.

Alimentos: amostras de polpas de frutas congeladas – cajá e tamarindo – foram adquiridas em supermercados da cidade de São Paulo, SP. Para o descongelamento, essas polpas foram mantidas a 4°C por 24 h antes do uso. O pH de cada polpa foi determinado usando pHmetro (Model DMPH-2, Digimed, Brasil).

Métodos

Determinação da microbiota das polpas de fruta

Preparo das amostras: Polpas de frutas congeladas, adquiridas em supermercados da cidade de São Paulo, SP, foram mantidas sob refrigeração a 4°C por 24h para descongelamento. Posteriormente, 1 mL de cada amostra dessa polpa descongelada foi diluída e homogeneizada em 9 mL de salina fisiológica (0,85%). A partir dessa diluição procedeu-se à diluição decimal seriada até 10^{-3} no mesmo diluente. Essas diluições foram utilizadas nas seguintes análises:

- Enumeração total de microrganismos facultativos mesófilos: 1 mL de cada diluição foi semeado, em duplicata, em placas Petrifilm® (3M) e incubado a 35°C por 48h;

- Enumeração total de psicrotóxicos: 0,1 mL das diluições acima citadas foi semeado em placas com ágar Padrão para Contagem (PCA) – em duplicata. As placas foram incubadas a 7°C por 10 dias;

- Enumeração de bolores e leveduras: foi empregado o mesmo procedimento descrito para a enumeração total de microrganismos facultativos mesófilos, mas o inóculo foi feito em placas Petrifilm® (em duplicata) para contagem de bolores e leveduras. A incubação foi realizada a 25°C por 3 a 5 dias;

- Enumeração de microrganismos ácido-resistentes: 1 mL das diluições foi semeado, em duplicata, em placas de Petri; nestas, foi vertido o ágar Orange serum (Oxoid), com incubação a 30°C por 4 dias.

Determinação da resistência de cepas de STEC não O157:H7 em meios ácidos

Preparo do inóculo: cada tubo contendo uma cepa de STEC em meio de manutenção, mantido a -70 °C, foi vertido para caldo tripticase soja (TSB, Basingstoke,

Oxoid). Após incubação a 37 °C por 18-24h, 1 mL foi transferido para TSB (controle) e, paralelamente, 1mL foi transferido para TSB pH 5,0, ajustado com HCl, para adaptação ao choque ácido. Após incubação a 37 °C por 18-24h, realizaram-se diluições decimais das duas culturas, separadamente, em solução salina 0,85% até 10^{-4} . Um mL da cultura controle foi transferido para 100 mL de TSB e 1 mL do TSB pH 5,0 também foi transferido para 100 mL de TSB pH5,0. Esses erlenmeyers foram incubados, sob agitação (150rpm 37 °C) (Innova 4000, Incubator shaker, New Brunswick Scientific) até atingirem população de 10^7 UFC/mL, conforme previamente determinado por curva de crescimento. O crescimento das culturas foi monitorado espectrofotometricamente.

Ensaio de ácido-resistência: a ácido-resistência de células de STEC não O157 em dois diferentes estágios fisiológicos (ácido-adaptadas e controle) foi determinada em polpas sabor cajá e sabor tamarindo. Para tanto, 27g de cada polpa, previamente descongelada, foi inoculada com 3 mL das culturas que estavam sob agitação e foram armazenadas por até 30 dias a 4 °C.

Para determinar a viabilidade dos microorganismos, alíquotas de 1mL foram retiradas nos dias 0 (logo após a inoculação), 1, 4, 6, 11, 13, 18, 20, 26 e 30. Foram realizadas diluições decimais em solução salina 0,85%, em duplicata e, a partir de cada diluição, 1 mL foi semeado, por profundidade, em ágar tripticase soja (TSA, Oxoid) e, paralelamente, 0,1 mL foi semeado em superfície de ágar MacConkey sorbitol (SMAC, Oxoid). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Os experimentos foram repetidos, sob as mesmas condições, em 3 diferentes ocasiões. Paralelamente, o mesmo ensaio foi realizado, porém substituindo a polpa de fruta descongelada por TSB com pH semelhante ao da polpa em estudo, ou seja, TSB pH 2,3 para cada uma das polpas.

Foram, ainda, determinadas as populações iniciais presentes em TSB pH 7,0 e TSB pH 5,0. Para tanto, foram realizadas diluições decimais em solução salina 0,85% até 10^{-8} e, 1 mL de cada diluição foi semeado em profundidade e, em duplicata, utilizando TSA.

Análise Estatística: foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparar o comportamento das cepas controle (pH 7,0) e ácido-adaptadas (pH 5,0). Para isso, utilizamos a versão 7.5 do *software* Assistat[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações de microorganismos psicrotróficos e bolores e leveduras apresentaram valores inferiores a log 1 UFC/mL em ambas as polpas além da população de microorganismos mesófilos em polpa de tamarindo que também foi inferior a log 1 UFC/mL. Por outro lado, a polpa sabor cajá apresentou populações médias de microorganismos mesófilos de log 2,7 UFC/mL e de ácido-resistentes de 2,4 UFC/mL enquanto na polpa de tamarindo, este último grupo de microorganismos apresentou uma população de 1,9 UFC/mL. Esses valores podem ser considerados adequados para esse tipo de alimento.

O pH médio, de três repetições independentes, para as duas polpas foi de 2,3.

As populações dos inóculos em todos os ensaios foi de 6 log UFC/mL.

As cepas de *E. coli* O103, O111 e O26, provenientes de TSB controle e TSB pH5, (ácido-adaptação), inoculadas em polpas de cajá ou de tamarindo apresentaram-se viáveis até o dia 30, quando semeadas em TSA. Porém, quando semeadas em ágar seletivo MacConkey sorbitol (SMAC), a recuperação das cepas ficou restrita, no máximo, até o dia 1, o que mostra a influência do pH ácido, quer seja da polpa quer seja do meio de cultura.

Quando estas mesmas bactérias foram inoculadas em TSB pH 2,3, elas também apresentaram-se viáveis por um curto período de tempo (de 0 a 1 dia), tanto quando da recuperação em TSA como na recuperação em SMAC.

A Figura 1 apresenta a recuperação das três cepas de STEC após terem sido expostas às diferentes condições estabelecidas neste estudo: controle (TSB pH 7,0) seguido de inoculação em polpa de cajá (Figura 1Aa), células ácido-adaptadas (TSB pH 5,0) inoculadas em polpa de cajá (Figura 1Ba) e controle seguido de inoculação em TSB pH 2,3 (pH da polpa de cajá) (Figura 1Ab). As populações são as obtidas em TSA, uma vez que no ágar MacConkey sorbitol não houve crescimento de colônias, o que mostra a importância do emprego de meios não seletivos. O nível de inóculo foi de 6-7 log UFC/mL. Observa-se na (Figura 1Aa) que as populações das cepas O103 e O26, cultivadas em TSB pH 7,0, apresentaram um declínio de, aproximadamente, 3,5 log UFC/mL quando inoculadas na polpa de cajá, já no dia zero, o que sugere a ocorrência do choque ácido. Após o choque, no entanto, os microorganismos permaneceram viáveis ao longo do período de armazenamento. A população da cepa O111, porém, não sofreu o mesmo tipo de estresse uma vez que não apresentou redução no dia zero. No entanto, essa mesma redução foi constatada após 24 horas de armazenamento, permanecendo com esses valores até o final do período de estocagem. A manutenção das populações por volta de 2 log UFC/mL, entretanto, não foi observada quando da inoculação dos sorogrupos em TSB pH 2,3, pH semelhante

ao da polpa da fruta em estudo (Figura 1Ab). Neste caso, as cepas O26 e O103 não foram recuperadas logo após a inoculação enquanto a O111 sofreu uma redução entre 4 -5 log UFC/mL, mostrando o efeito do estresse. Nas 24 horas seguintes, essa cepa apresentou redução de mais 1,6 log UFC/mL. Após esse período, nenhum sorogrupo foi recuperado pelo método empregado (Figura 1Ab).

Já a Figura 1Ba, mostra que, apesar de expostas ao pH 5,0 para ácido adaptação, as cepas não conseguiram manter a população inoculada (log 6 -7) uma vez que após 24 horas de armazenamento apresentaram reduções de 2 log UFC/mL (O103) e de mais de 3 log UFC/mL para O26 e O111, respectivamente. Provavelmente, os ácidos orgânicos ou outro fator intrínseco dessa polpa atuam sobre as células ácido-adaptadas impedindo que a população inoculada permaneça no mesmo nível por mais de 24 horas. Ou, pode-se também considerar que os fatores intrínsecos desse alimento não são suficientes para proteger as células microbianas, mesmo elas tendo sofrido um processo de ácido adaptação.

Quando inoculada em polpa de tamarindo, os microorganismos estudados apresentaram, de maneira geral, comportamento semelhante ao de quando inoculados em polpa de cajá. As exceções foram, quando da inoculação nesta polpa, o sorogrupo O26 apresentou melhor resistência, inicialmente, em vez do sorogrupo O111 (Figura 2Aa). Na Figura 2Ba, as diferenças que podem ser observadas dizem respeito às populações no tempo zero, que nesta polpa já apresentaram reduções de 2-3 log UFC/mL; na Figura 2Ab, ao contrário da Figura 1Ab, houve a recuperação de células dos 3 sorogrupos no dia zero, apesar de todas as populações apresentarem redução.

Quando analisamos o comportamento de cada cepa nos meios estudados – polpas de cajá e tamarindo e TSB pH 2,3 – constata-se que a população de *E. coli* O103 (controle) no dia zero sofreu choque ácido (redução da população em 4 log UFC/mL) e posteriormente manteve-se constante independente da polpa em que foi inoculada. A população que sofreu ácido-adaptação, por sua vez, não sofreu a ação do pH tão logo foi inoculada porém, após 24 horas já se observou diminuição, com a população igualando-se a das células controle. A inoculação em meio de cultura com pH igual ao da polpa mostra que este não apresenta fatores intrínsecos que ofereçam proteção à célula microbiana, uma vez que desde o dia zero a população foi de 1 log UFC/mL (para a polpa de cajá), acontecendo o mesmo após 24 horas, para a polpa de tamarindo. Vale ressaltar que as duas polpas apresentaram o mesmo pH. (Figuras 3 e 4).

As populações-controle do sorogrupo O111 de *E. coli* e as ácido-adaptadas não apresentaram alteração no dia zero quando na polpa de cajá. Porém

apresentaram diminuição de aproximadamente 4 log UFC/mL nas primeiras 24 horas permanecendo estável ao longo do período de armazenamento (Figura 5). Na polpa de tamarindo, as populações-controle do sorogrupo O111 e as ácido-adaptadas apresentaram redução de 4 e 3 log UFC/mL, respectivamente; após 24 horas, a cepa ácido-adaptada se iguala à população da cepa controle e ambas permanecem assim até o fim do experimento (Figura 6). Estas mesmas cepas, quando retiradas de TSB com pH semelhante ao das polpas (2,3) sofrem uma queda de, pouco mais de 4 log UFC/mL no tempo zero e depois apresentam uma população menor que 1 log UFC/mL ao longo do período de armazenamento (Figuras 5 e 6).

As populações controle de *E. coli* O26 sofreram uma redução de 3,5 log UFC/mL imediatamente após a inoculação em polpa de cajá e mantiveram-se viáveis em, aproximadamente, 2,5 log UFC/mL ao longo do tempo (Figura 7). Em polpa de tamarindo o comportamento foi semelhante diferindo apenas no valor da redução que foi de 2,5 log UFC/mL no tempo zero (Figura 8).

Quando ácido-adaptada - cepa O26 em polpa de cajá - não há redução da população no tempo zero, tal fato ocorrendo, porém, nas primeiras 24 horas com o microorganismo permanecendo viável com população semelhante à das células controle (Figura 7). Na polpa de tamarindo, as populações das cepas O26 ácido-adaptadas reduziram 3 log UFC/mL no dia zero e mais 1 log UFC/mL no dia 1, permanecendo deste modo até o dia 30 (Figura 8). Esse mesmo sorogrupo, quando inoculado em TSB pH 2,3 já apresenta redução de 6 log UFC/mL no tempo zero, na polpa de cajá (Figura 7). Quando do experimento com a polpa de tamarindo, apesar de o inóculo ter sido realizado no mesmo TSB com pH 2,3, igual ao da polpa de cajá, observamos um diferença no comportamento deste sorogrupo. No tempo zero, houve uma redução da população em 3,5 log UFC/mL e só após as primeiras 24 horas é que contagens inferiores a 1 log foram obtidas (Figura 8).

De acordo com as análises estatísticas realizadas (teste de Tukey), não houve diferença estatisticamente significativa (ao nível de 5% de probabilidade) entre as populações das cepas controle (pH 7,0) e ácido-adaptadas (pH 5,0) quando inoculadas nas polpas de cajá e tamarindo e mantidas por 30 dias a 4 °C.

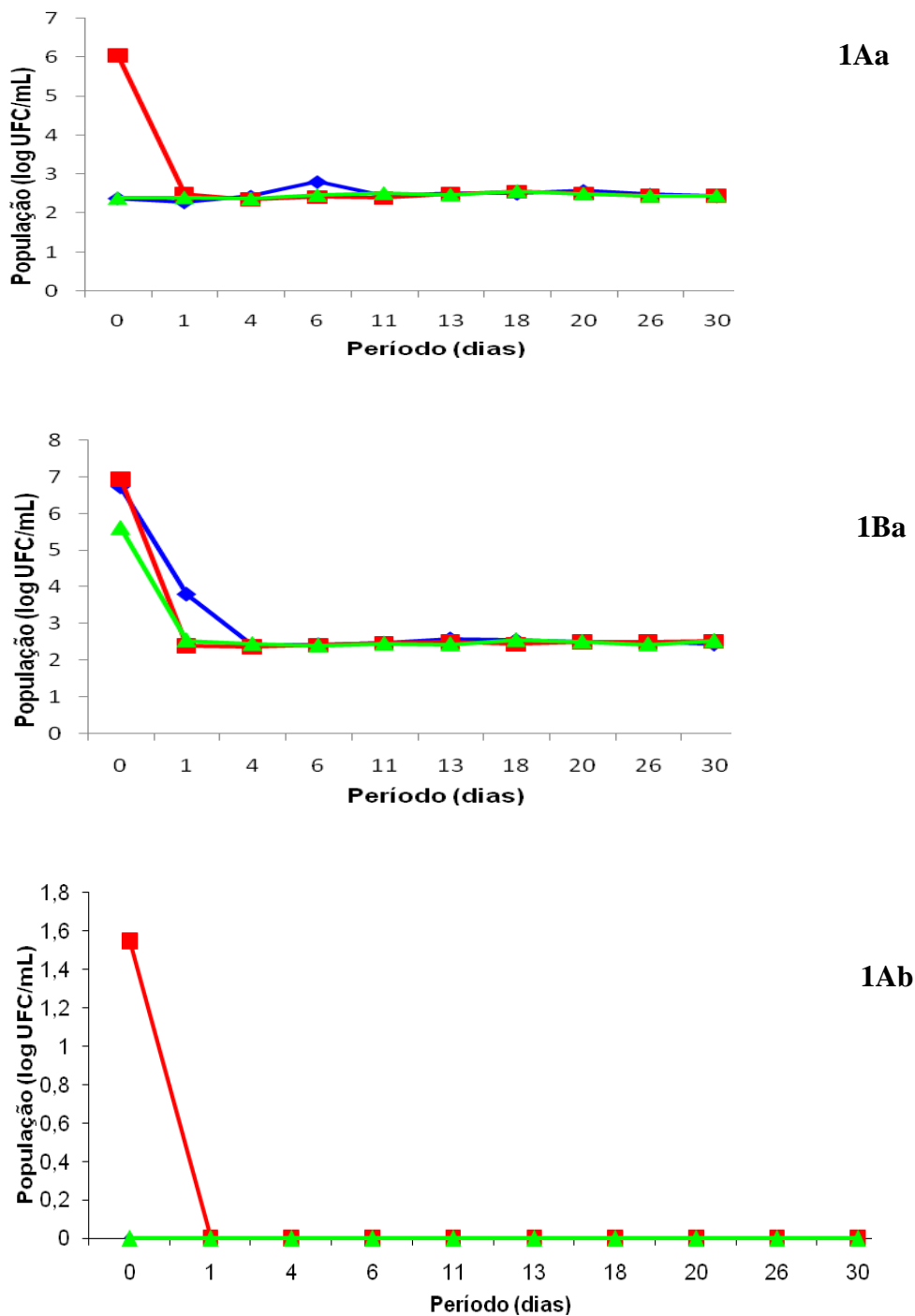


Figura 1. Recuperação das cepas controle (A) e ácido-adaptadas (B) de *E. coli* O103 (azul), O111 (vermelho) e O26 (verde) em ágar tripticase soja provenientes de polpa de cajá (a) e caldo de soja tripticase pH 2,3 (b) armazenados a 4 °C por 30 dias.

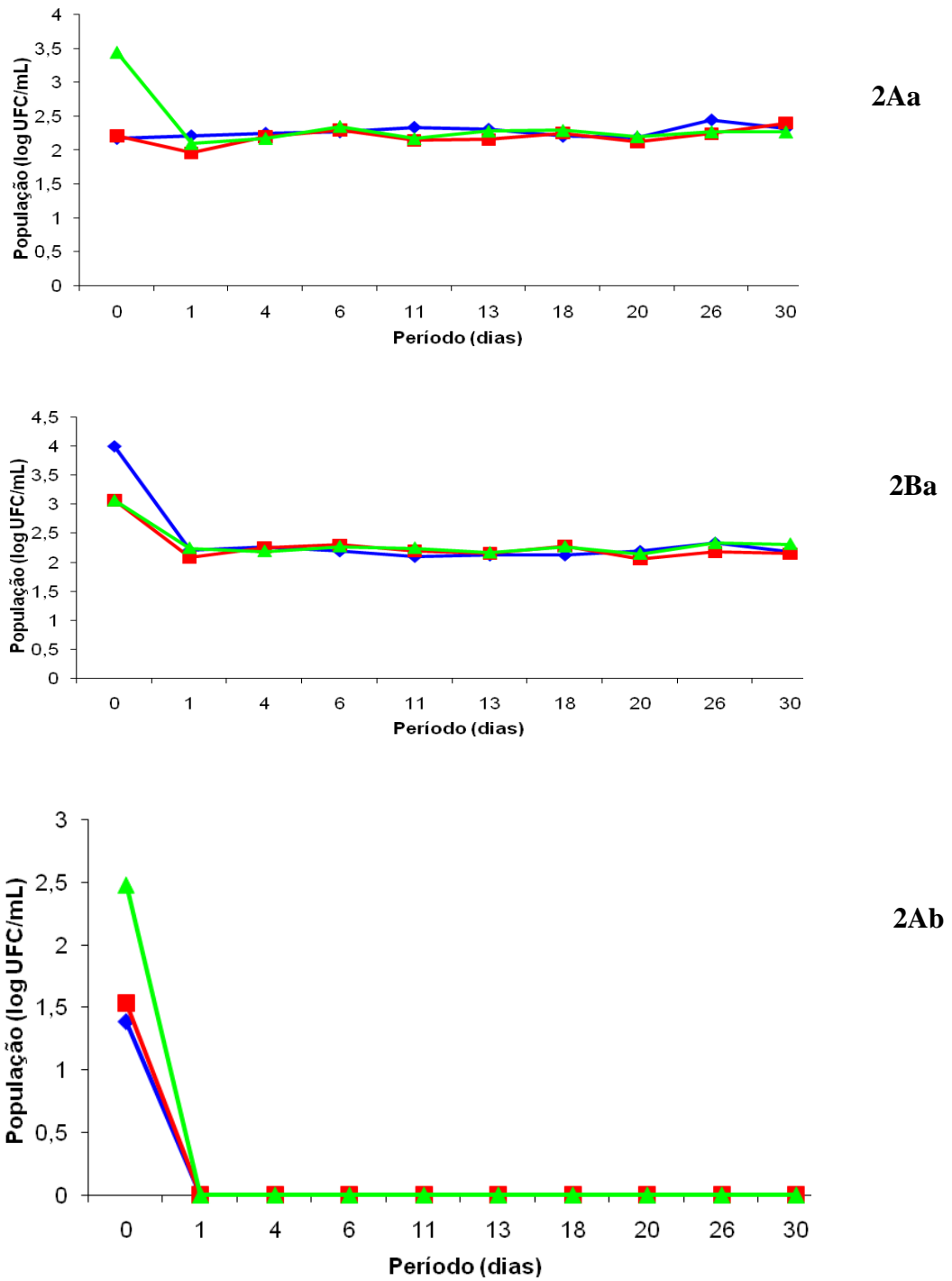


Figura 2. Recuperação das cepas controle (A) e ácido-adaptadas (B) de *E. coli* O103 (azul), O111 (vermelho) e O26 (verde) em ágar tripticase soja provenientes de polpa de tamarindo (a) e caldo de soja tripticase pH 2,3 (b) armazenados a 4 °C por 30 dias.

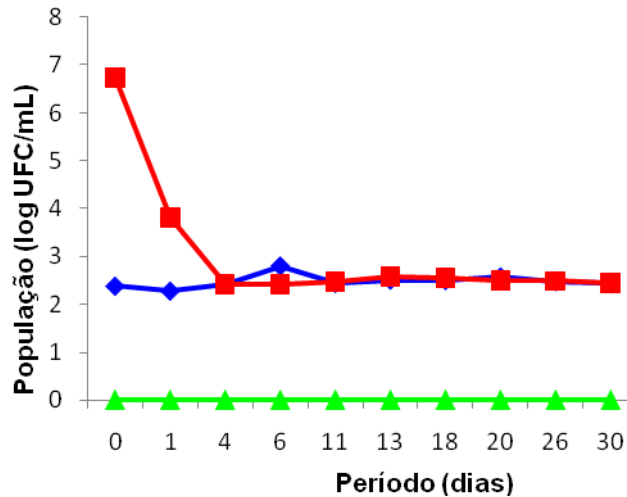


Figura 3. Comportamento de população controle de *E. coli* O103 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de cajá e de população controle de *E. coli* O103 inoculada em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

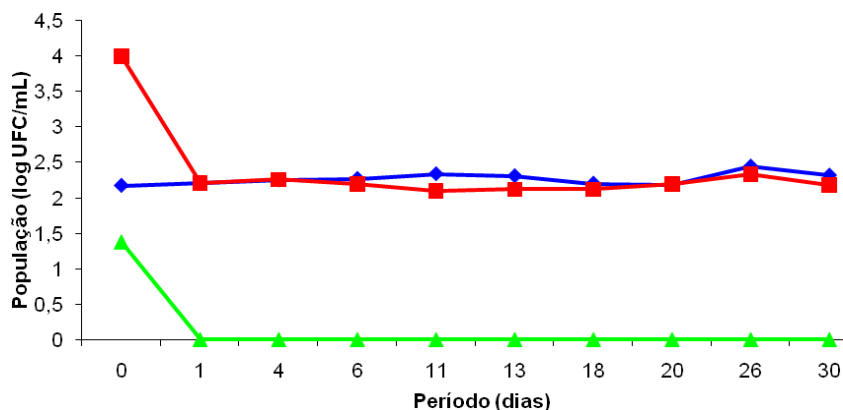


Figura 4. Comportamento de população controle de *E. coli* O103 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de tamarindo e de população controle de *E. coli* O103 inoculadas em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

Taormina *et al.* (41) também demonstraram a ineficiência de meios seletivos em recuperar células injuriadas de *E. coli* O157:H7 de carnes. Células injuriadas ou estressadas são mais susceptíveis aos componentes seletivos destes meios e, portanto, apresentam baixa recuperação. Estes resultados subestimam as populações de *E. coli* O157:H7 e, conseqüentemente, a sua sobrevivência em alimentos. Estudo realizado com pepperoni demonstra diferenças não significativas entre SMAC e TSA com sobrecamada de SMAC na recuperação de *E. coli* O157:H7. Porém, a injúria em

pH muito baixo (4,4 a 4,6) gerou resultados com diferenças significativas na recuperação entre os dois meios (37).

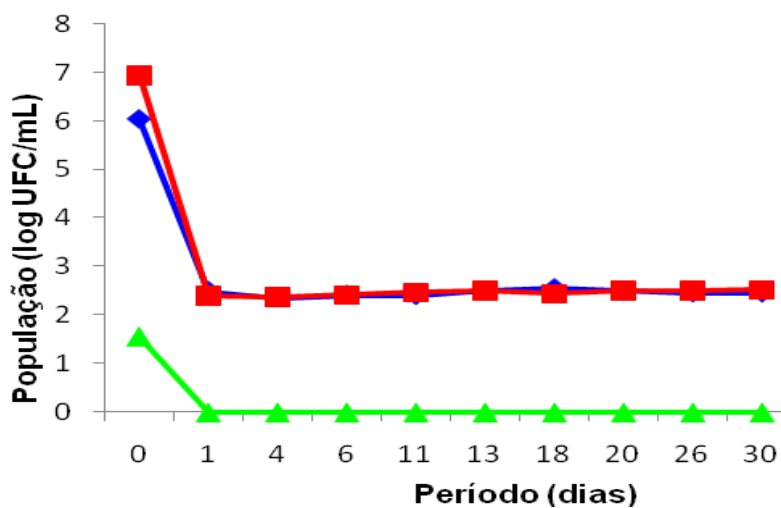


Figura 5. Comportamento de população controle de *E. coli* O111 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de cajá e de população controle de *E. coli* O111 inoculada em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

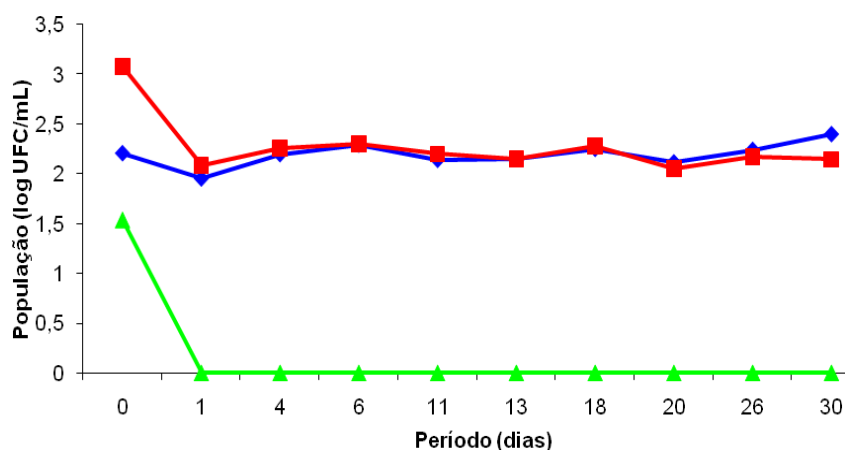


Figura 6. Comportamento de população controle de *E. coli* O111 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de tamarindo e de população controle de *E. coli* O111 inoculada em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

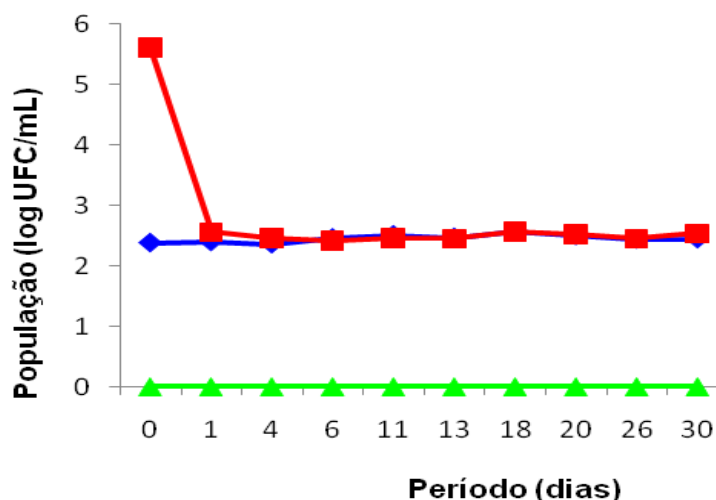


Figura 7. Comportamento de população controle de *E. coli* O26 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de cajá e de população controle de *E. coli* O26 inoculada em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os relatados por Uyttendaele *et al.* (44) que constaram a melhor recuperação de cepas do sorotipo O157:H7 quando semeadas em TSA do que em SMAC, o que permite inferir que o SMAC não recupera quantitativamente células injuriadas de *E. coli* O157:H7.

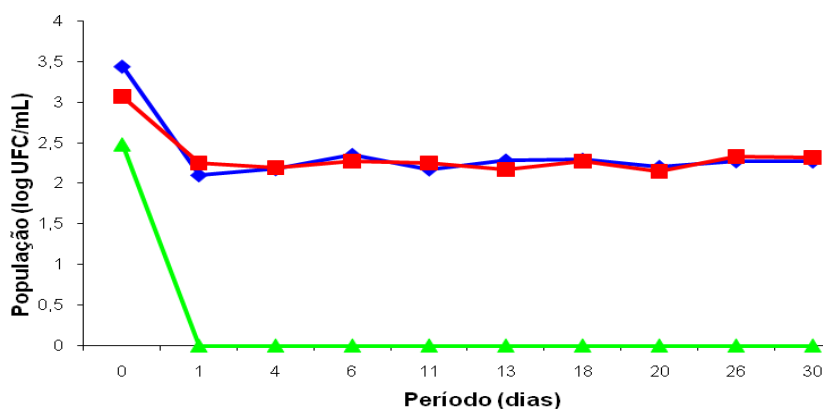


Figura 8. Comportamento de população controle de *E. coli* O26 (azul) e ácido-adaptada (vermelho) inoculada em polpa de tamarindo e de população controle de *E. coli* O26 inoculada em TSB com pH 2,3 (verde), armazenados a 4 °C por 30 dias.

Células ácido-adaptadas são aquelas que foram expostas a um declínio gradual do pH do ambiente, enquanto que células submetidas ao choque ácido são aquelas que foram expostas a uma mudança abrupta de um pH alto para um baixo pH (1).

Alimentos ácidos são aqueles que apresentam pH igual ou inferior a 4,6 (6). Esses alimentos ácidos são considerados seguros do ponto de vista microbiológico porque os ácidos orgânicos forçam o pH interno do microorganismo a diminuir devido ao influxo de íons hidrogênio, interrompendo várias funções relacionadas ao metabolismo (49).

Muitas bactérias patogênicas podem resistir à acidez inerente ao suco de fruta ao desenvolver mecanismos adaptativos que aumentam sua sobrevivência e até mesmo sua habilidade de se multiplicar nesses ambientes ácidos (45).

Em estudo semelhante ao aqui relatado, mas utilizando cepas de *E. coli* O157:H7 e polpa de cajá, os microorganismos sobreviveram no máximo até o 12º dias de análise, tanto as células em condições controle (pH 7,0) como após a ácido adaptação (pH 5,0) (29). Os autores (29) descreveram que a viscosidade de polpas de frutas estava relacionada à sobrevivência de *E. coli* O157:H7 durante armazenamento: quanto menor a viscosidade da polpa de fruta, maior a sobrevivência bacteriana. Ambas as polpas estudadas eram, visualmente, muito viscosas, sendo a de tamarindo ainda mais viscosa do que a de cajá.

Algumas cepas de microorganismos, entre eles, *E. coli* O157:H7 utilizam-se de mecanismos celulares para sobreviverem em ambientes ácidos (13). Um deles é o sistema *rpoS*-dependente, que está associado com a produção de proteínas do ácido choque. O outro é um sistema *rpoS*-independente que remove o excesso de prótons do citoplasma utilizando um sistema aminoácido descarboxilase. Entretanto, pouco se sabe acerca de mecanismos de resistência ao estresse ácido em STEC não-O157.

A viabilidade das cepas O26, O103 e O111 no pH 2,3 ao longo da 30 dias e ainda em temperatura de refrigeração deve ser um alerta para a indústria de sucos e outros produtos ácidos pois até o momento não se sabe qual é a dose infectante. Caso seja semelhante ao de *E. coli* O157H7, 10-100 UFC/g ou mL do alimento, a população que permaneceu viável poderá por em risco a saúde da população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Iniciação Científica (Processo: 2008/) e aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo comprometimento oferecido a esta pesquisa. Agradecemos também a professora Dra. Vera Lúcia Mores Rall, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela supervisão de estágio da primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEE, T.; WOUTERS, J.A.; Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.65-71, 1999.
2. ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.2037-2039, 1995.
3. AUVRAY, F.; LECUREUIL, C.; TACHÉ, J.; PERELLE, S.; FACH, P. Development of 5'nuclease PCR assay for the identification of *Escherichia coli* strains expressing the flagellar antigen H21 and their detection in food after enrichment. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.899-905, 2008.
4. BANATVALA, N.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D. *et al.* The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: Microbiologic, serologic, clinical and epidemiological findings. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1063-1070, 2001.
5. BELL, C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.197-216, 2002.
6. BJORNSDOTTIR, K.; BREIDT, F.J.R.; McFEETERS, R.F. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.660-664, 2006.
7. BONO, J.L.; KEEN, J.E.; CLAWSON, M.L.; DURSO, L.M.; HEATON, M.P.; LAEGREID, W.W. Association of *Escherichia coli* O157:H7 *tir* polymorphisms with human infection. **BMC Infectious Diseases**, v.7:98, p.1471-2334, 2007.
8. BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Effect of water activity and humectants identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v.14, p.413-423, 1997.
9. CHART, H. VTEC enteropathogenicity. Symp. **Ser. Soc. Appl. Microbiol.**, v.29, p.12S-23S, 2000.
10. CONNER, D.E.; KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.382-385, 1995.
11. DONNEMBERG, M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends in Microbiology**, v.5(3), p.109-114, 1997.
12. ELIAS-JÚNIOR, W.P.; GOMES, T.A.T. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.289-292.

13. FOSTER, J.W. Microbial responses to acid stress. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Eds.), **Bacterial Stress Responses**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.99-115, 2000.
14. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu, São Paulo, 1996. p.33-81.
15. FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; TRABULSI, L.R.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G.; MATTHEWS, S. Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? **Trends in Microbiology**, v.9, p.214-218, 2001.
16. FRANZOLIN, M.R.; CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* que causa infecções extra-intestinais (ExPEC - extraintestinal pathogenic *E. coli*). ELIASJÚNIOR, W.P.; GOMES, T.A.T. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.303-309.
17. FREMAUX, B.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; PRINGENT-COMBARET, C.; GLEIZAL, A.; VERNOSY-ROZAND, C. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.89-99, 2007.
18. GERBER, A.; KARCH, H.; ALLENBERGER, F.; *et al.* Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000. In: Germany and Austria: A prospective study. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.493-500, 2002.
19. GILBERT, R.A.; DENMAN, S.E.; PADMANABHA, J.; FEGAN, N.; AJMI, D.A.; McSWEENEY, C.S. Effect of diet on the concentration of complex Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and EHEC virulence genes in bovine faeces, hide and carcass. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.208-216, 2008.
20. GLASS, K.A.; LOEFFELHOLZ, J.M.; FORD, J.P.; DOYLE, M.O. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied Environment Microbiology**, v.58, p.2513-2516, 1992.
21. GOBERT, A.P.; COSTE, A.; GUZMAN, C.A.; VAREILLE, M.; HINDRÉ, T.; DE SABLET, T.; GIRARDEAU, J-P.; MARTIN, C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. **Microbes and Infection**, v.10, p.159-165, 2008.
22. GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo, 5ª ed., 2008. p.289-293.
23. INCZE, K. Dry fermented sausages. **Meat science**, v.49, n.1, p.S169-S177, 1998.
24. KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by

- verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.(189)3, p.556-563, 2004.
25. KAWANO, K.; OKADA, M.; HAGA, T.; MAEDA, K.; GOTO, Y. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. **Europe Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.27, p.227-232, 2008.
26. KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.24, p.107-117, 2000.
27. LA RAGIONE, R.M.; BEST, A.; WOODWARD, M.J.; WALES, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v.33, p.394-410, 2009.
28. LAW, D.; The story and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.701-709, 2000.
29. MARQUES, P.A.H.F.; WORCMAN-BARNINKA, D; LANNES, S.C.S.; LANDGRAF, M. Acid tolerance and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in fruit pulps stored under refrigeration. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1674-1678, 2001.
30. MARTINEZ, M.B. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.299-301.
31. MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.
32. MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, .P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**, 2nd ed., Washington, DC: ASM Press, p.193-213, 2001.
33. NAGY, J.O.; ZHANG, Y.; YI, W.; LIU, X.; MORTARI, E.; SONG, J.C.; LEJEUNE, J.T.; WANG, P.G. Glycopolymers as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.700-703, 2008.
34. ORDOÑEZ, J.G. *Escherichia coli* enterotoxigênica. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.293-297.
35. PARK, C.M.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in potato starch as affected by water activity, pH and temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.364-367, 2000.

36. RAM, S.; VAIPAYEE, P.; SHANKER, R. Contamination of potable water distribution systems by multiantimicrobial-resistant enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Environmental Health Perspectives**, v.116, p.448-452, 2008.
37. RIORDAN, D.C.R.; DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.; EBLEN, B.S.; WHITING, R.C.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, d.a. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of pepperoni. **Journal of Food Protection**, v.61, p.146-151, 1998.
38. RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. **Food microbiology**, v.16, p.317-324, 1999.
39. SKANDAMIS, P.N.; STOPFORTH, J.D.; ASHTON, L.V.; GEORNARAS, I.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. **Food Microbiology**, v.26, p.112-119, 2009.
40. SMITH, H.R. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: cause for concern. **Society of General Microbiology Quart.**, v.42, p.54-55, 1997.
41. TAORMINA, P.J.; ROCELLE, M.; CLAVERO, S.; BEUCHAT, L.R. Comparison of selective agar media and enrichment broths for recovering heat-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Food Microbiology**, v.15, p.631-638, 1998.
42. TAVARES, T.M.; SERAFINI, A.B. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: aspectos legais e riscos bacterianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n.1, p.1-21, 2006.
43. TRABULSI, L.R.; ORDOÑEZ, J.G. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.(Eds.). **Microbiologia**. São Paulo, 2005. p.277-283.
44. UYTENDAELE, M.; TAVERNIERS, I.; DEBEVERE, J. Effect of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.66, p.31-37, 2001.
45. VAN OPSTAL, I.; BAGAMBOULA, C.F.; THEYS, T.; VANMUYSEN, S.C.M.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* and *Shigella* in acidic fruit and vegetable juices by peroxidase systems. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.242-250, 2006.
46. VISCARDI, M.; PERUGINI, A.G.; AURIEMMA, C.; CAPUANO, F.; MORABITO, S.; KIM, K-P.; LOESSNER, M.J.; IOVANE, G. Isolation and characterization of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.152-157, 2008.
47. WELLS, T.J.; SHERLOCK, O.; RIVAS, L.; MAHAJAN, A.; BEATSON, S.A.; TORPDAHL, M.; WEBB, R.I.; ALLSOPP, L.P.; GOBIUS, K.S.; GALLY, D.L.; SCHEMBRI, M.A. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic

Escherichia coli O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v.10(3), p.589-604, 2008.

48. WU, V.C.H.; QIU, X.; HSIEH, Y.H.P. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice with *Cornus* fruit (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) extract by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, v.25, p.190-195, 2008.

49. YUK, H.G.; MARSHALL, D.L. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3500-3505, 2004.

50. YUK, H.G.; JO, S.C.; SEO, H.K.; PARK, S.M.; LEE, S.C. Effect of storage in juice with or without pulp and/or calcium lactate on the subsequent survival of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p.198-203, 2008.