

Comportamento de *Escherichia coli* entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia

Behavior of enterohemorrhagic, enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli* in ambrosia

RIALA6/1618

Marina de Mattos FERRASSO*, Camile MILAN, Débora Rodrigues SILVEIRA, Cláudio Dias TIMM

*Endereço para correspondência: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, pr. 34, Pelotas, RS CEP: 96010-900 - Fone: (53) 3275-7216. E-mail: marinaferrasso@gmail.com

Recebido: 11.04.2014 - Aceito para publicação: 30.09.2014

RESUMO

Ambrosia é um tipo de doce de leite preparado artesanalmente com leite, ovos e açúcar, muito consumido na América do Sul, e comumente comercializado em feiras livres, supermercados e docerias. A contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos geralmente ocorre durante as etapas de processamento, nos centros de distribuição, no mercado varejista ou na casa do consumidor. Neste trabalho foi avaliado o comportamento dos agentes patogênicos *Escherichia coli*: entero-hemorrágica (EHEC) ATCC 4895, enteropatogênica (EPEC) INCQS 00182 e enteroinvasiva (EIEC) ATCC 43893 em amostras de ambrosia. Aliquotas de ambrosia foram experimentalmente contaminadas com as cepas analisadas no estudo. Foram realizadas pesquisas do micro-organismo inoculado após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem. EHEC foi recuperada de todas as amostras até cinco dias após a contaminação. EPEC sobreviveu na ambrosia e foi isolada até o quarto dia do experimento. A cepa de EIEC conseguiu permanecer viável durante os 30 dias de estocagem. As cepas patogênicas de *E. coli* estudadas mostraram diferente comportamento em ambrosia, mas todos representam perigo potencial para a saúde dos consumidores. Este estudo serve como alerta em relação à necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias apropriadas durante a produção, embalagem e manipulação da ambrosia.

Palavras-chave. doce de leite, *Escherichia coli*, segurança alimentar.

ABSTRACT

Ambrosia is a type of Dulce de Leche hand-made with milk, eggs and sugar, widely consumed in South America, and it is commonly sold in street markets, supermarkets and candy shops. Food contamination by pathogenic micro-organisms usually occur during the processing steps, at the distribution centers, at the retail market or in the consumer home. This study aimed at evaluating the behavior of the pathogenic strains of *Escherichia coli* enterohemorrhagic (EHEC) ATCC 43895, enteropathogenic (EPEC) INCQS 00182 and enteroinvasive (EIEC) ATCC 43893 in ambrosia samples. Aliquots of ambrosia were experimentally contaminated by the strains analyzed in this study. Detections of the inoculated microorganisms were done at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 and 30 days of storage. EHEC was recovered from all of analyzed samples until five days after infection. EPEC survived in ambrosia and it was isolated until the fourth day of the experiment. EIEC strain remained viable during the 30 days of storage. The analyzed pathogenic strains of *E. coli* showed different behavior in ambrosia, but all of them demonstrated potential danger to the consumers health. This study works for warning to adopt appropriate hygiene and sanitary actions during the ambrosia production, packaging and manipulation.

Keywords. dulce de leche, *Escherichia coli*, food security.

INTRODUÇÃO

Segundo a legislação vigente no Brasil, entende-se por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração do leite sob ação do calor, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme adicionado de sacarose¹. A ambrosia é um tipo de doce de leite produzido artesanalmente com leite, ovos e açúcar.

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por um agente infeccioso específico ou por toxinas por ele produzidas². A maioria dos países com sistemas de notificação de casos de DTA tem documentado aumentos significativos dessas enfermidades ao longo das últimas décadas³. Essas enfermidades são responsáveis por altos níveis de morbidade e mortalidade na população em geral, mas principalmente em grupos de risco, como crianças jovens, crianças, idosos e imunocomprometidos⁴.

A ambrosia se enquadra como possível fonte de contaminação para humanos, tendo em vista que sua matéria-prima, leite e ovos, pode ser veiculadora de patógenos e que a sua produção geralmente é artesanal, nem sempre atendendo aos preceitos das boas práticas de fabricação.

Escherichia coli são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, caracterizando-se como bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás⁵. Essas bactérias podem adquirir atributos específicos de virulência e tornarem-se patogênicas, apresentando diferentes patogenias que são utilizadas para a classificação das cepas em patótipos. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) está associada a surtos de diarreia, pois coloniza o intestino por meio de adesinas e produz toxinas que induzem a liberação de fluido intestinal⁶. *E. coli* enteropatogênica (EPEC) causa diarreia infantil e é mais frequente em países em desenvolvimento⁷. Possui capacidade de se aderir à mucosa intestinal, mediada por um fator de enteroadesência chamado EAF, e provocar destruição das microvilosidades⁸. O patótipo EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) possui como fator de virulência a produção de citotoxinas que podem provocar colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e morte^{9,10}. EIEC ou *E. coli* enteroinvasiva é um patógeno intracelular que multiplica-se dentro das células intestinais, provocando ulcerações do cólon que resultam em diarreia sanguinolenta^{9,6}. A maioria das cepas de EIEC apresenta diversas

características bioquímicas que as tornam diferentes das demais, entre elas estão a incapacidade de descarboxilar a lisina e a não fermentação ou fermentação tardia da lactose⁸.

As consequências da infecção por *E. coli* justificam a importância de determinar sua capacidade de sobrevivência e comportamento em alimentos, mesmo naqueles que não apresentam as condições ideais para sua multiplicação e desenvolvimento, como doce de leite pastoso e ambrosia. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de sobrevivência e comportamento de *E. coli* entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da ambrosia

A ambrosia utilizada foi preparada com um litro de leite pasteurizado padronizado a 3 % de lipídios, uma dúzia de ovos de galinha (gema e clara) e 500 gramas de açúcar. Os ingredientes foram homogeneizados em um tacho aberto de aço inoxidável e mantidos em fogo baixo, sem mexer, por aproximadamente 3 h. Posteriormente, alíquotas de 25 gramas foram asepticamente pesadas e acondicionadas em sacos estéreis.

Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* EHEC ATCC 43895, EPEC INCQS 00182 (FIOCRUZ) e EIEC ATCC 43893.

Inóculos

As cepas de EHEC, EPEC e EIEC foram cultivadas em 3 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan) a 37 °C por 24 h. Depois, um novo cultivo a partir desse primeiro foi realizado por mais 24 h. Após, foram preparadas diluições seriadas para contagens em ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Acumedia, Michigan, USA) e para o preparo dos inóculos com concentrações de 10⁴ UFC/mL.

Contaminação experimental de ambrosia e contagem de *E. coli*.

As amostras de 25 g de ambrosia contidas nos sacos estéreis foram contaminadas com 0,25 mL de inóculo, obtendo-se a concentração final de aproximadamente

10² células bacterianas por grama de doce. As amostras experimentalmente contaminadas foram homogeneizadas nos sacos em que foram acondicionadas, mantidas a 20 °C e analisadas depois de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de 25 gramas de ambrosia não contaminada experimentalmente. Para a contagem, foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP)¹¹. A cada alíquota de 25 g de ambrosia, foram adicionados 225 mL de solução salina a 0,85 % (m/v) com 20 % de glicose para obtenção da diluição 10⁻¹, sendo as demais diluições decimais preparadas a partir dessa. Para semear a diluição 10⁰, 10 mL da diluição 10⁻¹ foram adicionados a 10 mL de Caldo Lauril Sulfato (Acumedia) concentração dupla. 1,0 mL de cada diluição subsequente foi semeado em uma série de três tubos de ensaio de Caldo Lauril Sulfato. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 h. Para as amostras contaminadas com EHEC e EPEC após a incubação, as diluições que apresentaram formação de gás foram repicadas para tubos de ensaio com 10 mL de Caldo Bile Verde Brilhante (Acumedia) com tubos de Durham e incubadas a 37 °C por 48 h. Os tubos de cada diluição foram contados considerando a formação de gás e os resultados foram obtidos com uso de uma tabela para

NMP. Para as amostras contaminadas com EIEC, devido a não fermentação de lactose e ausência de formação de gás, após a incubação nos tubos com Caldo Bile Verde Brilhante, foram feitas sementeiras de cada diluição em ágar MacConkey (Acumedia) e incubadas a 37 °C por 24 h. O crescimento de colônias foi considerado como positivo para o tubo de origem. Os resultados finais das contagens foram obtidos com uso de uma tabela para NMP. O experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações de *E. coli* EHEC, EPEC e EIEC em amostras de ambrosia experimentalmente contaminadas estão relatadas na Tabela 1. Há poucos trabalhos sobre esse assunto na literatura, sendo esse o primeiro relato publicado sobre o comportamento de *E. coli* em ambrosia.

Apesar da baixa atividade de água e alta concentração de sacarose, a ambrosia mostrou ser um ambiente favorável à sobrevivência de cepas patogênicas de *E. coli*. A cepa de EHEC foi recuperada da ambrosia até cinco dias após a contaminação experimental. A sobrevivência deste patótipo também foi estudada

Tabela 1. Contagens de *Escherichia coli* (log NMP/g) em ambrosia experimentalmente contaminada

Tempo de estocagem	EHEC	EPEC	EIEC
Dia 0	1,99 ^A (0,4) ^a	1,66 ^A (0)	2,11 ^A (0,17)
Dia 1	2,22 ^A (1,41)	0,74 ^{AB} (0,15)	1,59 ^A (0,19)
Dia 2	2,06 ^A (1,13)	0,8 ^{AB} (0,88)	2,57 ^A (0,85)
Dia 3	1,86 ^A (1,54)	0^{Bb} (0)	2,72 ^A (0,93)
Dia 4	0,77^A (0,56)	0,32^B (0,45)	2,02^A (1,42)
Dia 5	0,2^A (0,28)	NR	2,42 ^A (1,14)
Dia 10	NR ^c	NR	1,33^A (0,02)
Dia 20	NR	NR	0,45^A (0,64)
Dia 30	NR	NR	0 ^A (0)

^{A,B} Médias com letras distintas na mesma coluna diferiram no teste de Tukey ($P < 0,05$)

^a Média de três repetições (desvio padrão)

^b Log 0 = número mais provável por g (NMP/g) menor que 1

^c NR = *E. coli* não foi recuperada em nenhuma repetição, considerando o limite de detecção da técnica, que é de 0,3 NMP/g

Valores em negrito = *E. coli* não foi recuperada de todas as repetições

por Timm et al¹², que avaliaram a capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em ambrosia. Em ambos os trabalhos, a bactéria manteve-se viável por algum tempo após a contaminação experimental, sendo recuperada até o décimo dia de estocagem. A dose infectante de *E. coli* O157:H7 pode ser menor que 100 células⁴, fator que, aliado à capacidade de sobrevivência desse micro-organismo em ambrosia, colabora para o aumento do risco potencial à saúde do consumidor. EPEC sobreviveu até quatro dias na ambrosia, tendo aumentado sua população no primeiro e segundo dias após a contaminação experimental, o que é indicativo de que a ambrosia proporciona um ambiente favorável para a manutenção desse patotipo, pelo menos nos primeiros dias após a contaminação. A cepa de EIEC mostrou ser capaz de se manter viável por longo período na ambrosia, uma vez que pôde ser recuperada até 30 dias após a inoculação, em uma das três repetições. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas nas populações de EIEC ao longo do período de estudo, o ambiente propiciado pela ambrosia parece não ter efeitos deletérios importantes sobre este patotipo.

Timm et al¹³ coletaram 28 amostras de doce de leite no comércio varejista da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, e observaram duas amostras (7,1 %) com presença de coliformes termotolerantes. Tais resultados sugerem que esse tipo de alimento pode veicular *E. coli*, considerando que esse micro-organismo é a espécie predominante em culturas de coliformes termotolerantes¹⁴. Esse dado reforça a importância deste estudo, tendo em vista que demonstra a provável sobrevivência de *E. coli* em doce de leite contaminado de forma não experimental. Embora Timm et al¹³ tenham trabalhado com doce de leite pastoso, este é o alimento com características mais próximas da ambrosia no qual já foi reportada a presença de coliformes termotolerantes. Peixoto, Weckwerh e Simionato¹⁵, por outro lado, avaliaram a qualidade microbiológica de produtos de confeitaria em Ribeirão Preto, São Paulo, no ano de 2008, e observaram contagens de coliformes termotolerantes <3 NMP/g em ambrosia, demonstrando a qualidade satisfatória das amostras analisadas, segundo os padrões estipulados pela RDC nº 12 da ANVISA².

Os três patotipos de *E. coli* avaliados mostraram capacidade de sobreviver em ambrosia, o que constitui um risco à saúde do consumidor, tendo em vista que o doce é comumente estocado no comércio ou mesmo no ambiente doméstico

por vários dias, podendo ser consumido quando os micro-organismos ainda estão viáveis no alimento. É importante ressaltar que boas práticas de manipulação pós-processamento são necessárias para evitar a contaminação desse alimento, principalmente devido à alta atividade de água do produto e o tratamento térmico durante o seu preparo.

CONCLUSÃO

Os patotipos de *E. coli* estudados mostraram capacidade para sobreviver em ambrosia, representando perigo potencial para a saúde dos consumidores. Os resultados servem como alerta em relação à necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias apropriadas durante a produção, embalagem e manipulação da ambrosia.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04/09/97. Diário Oficial [da] União, Brasília, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01, Diário Oficial [da] União, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.
3. WHO. World Health Organization. *In: Food Safety, Microbiological risks*. 2013b. [acesso 2013 Mai 4]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/micro/general/en/index.html].
4. WHO. World Health Organization. *In: Food Safety, Foodborne disease*. 2013a. [acesso 2013 Mai 4]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/en/].
5. Meng J, Doyle MP, Zhao T, Zhao S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *In: Doyle MP, Beuchat LR., Montville TJ. Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2. ed. Washington: ASM; 2001. p.141-77.
6. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:123-40.
7. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*. 2005; 73:18-29.
8. Franco BDGM, Landgraf M. *Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos*. *In: Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2003. Cap 4. p. 33-81.
9. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 1:142-201.
10. Ordoñez JG e Trabulsi LR. *Escherichia coli* Enteroemorrágica (EHEC) *In: Trabulsi LR, Altherthum F, Gompertz OF, Candeias, JAN. Microbiologia 4ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2004. Cap 37. p. 284-8*

11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.
12. Timm CD, Silva DT, Dias PA, Conceição RCS. Sobrevivência de micro-organismos patogênicos em ambrosia. *Semina: Ciências Agrárias* 2013;34(4):1829-34.
13. Timm CD, Conceição RCS, Coelho FJO, Roos TB, Tejada LS, Quevedo OS, et al. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo. 2007; 66:275-7.
14. Landgraf M. *Microorganismos indicadores*. In: Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2003. Cap 3. p.1 27-31.
15. Peixoto D, Weckwerh PH, Simionato EMRS. Evaluation of the microbiological quality of confectionery products sold in Ribeirão Preto – SP. *Alim Nutr*. 2009; 20(4):611-5.