

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Patrícia da Silva Malheiros
(Farmacêutica-Bioquímica / Opção: Tecnologia de Alimentos - UFSM)

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO, RESISTÊNCIA ÁCIDA E
RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS ENVOLVIDA EM
SURTOS ALIMENTARES OCORRIDOS NO RIO GRANDE DO SUL E
COMPARAÇÃO COM OUTROS SOROVARES

Porto Alegre
Janeiro 2007

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Patrícia da Silva Malheiros
(Farmacêutica-Bioquímica / Opção: Tecnologia de Alimentos - UFSM)

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO, RESISTÊNCIA ÁCIDA E
RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS ENVOLVIDA EM
SURTOS ALIMENTARES OCORRIDOS NO RIO GRANDE DO SUL E
COMPARAÇÃO COM OUTROS SOROVARES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Eduardo César Tondo

Porto Alegre
Janeiro 2007

Patrícia da Silva Malheiros
(Farmacêutica-Bioquímica / Opção: Tecnologia de Alimentos - UFSM)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007
Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 04/04/2007

Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

PLINHO FRANCISCO HERTZ
Banca – PPGCTA/UFRGS

MERCEDES PASSOS GEIMBA
Banca – Biocência-PUC/RS

MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA
CARDOSO
Banca – Veterinária
Preventiva/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e persistência para seguir esse caminho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, pela orientação, pelo exemplo profissional, por acreditar na minha capacidade e estar sempre disposto a ajudar.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, Prof. Dr. Caciano Z. Noreña, Prof. Dr. Júlio Xandro Heck pelas preciosas colaborações.

Ao Diego da Silva Timmers e à Cheila Daniel Minéia de Paula pela ajuda na realização de parte desse trabalho.

Às colegas do laboratório de Microbiologia do ICTA, Cheila, Taís, Ana Carolina, Fernanda, Sabrina e Karla pelos momentos de alegria e descontração.

À Manuela Poletto Klein pelo pronto atendimento em todas as solicitações e principalmente pela amizade.

Ao funcionário Jorge, por lavar tantas placas e tubos, contribuindo com as análises.

Ao pessoal do laboratório 218, de modo especial, a Silvana, Ana Paula e Daniel pela amizade e por sempre me ajudar quando solicitados.

Aos meus queridos e sempre lembrados colegas de mestrado, Ângela, Daniele, Flávia, Fernanda, Jozi, Marcelo e Michele pelo companheirismo, incentivo, e principalmente, pela amizade.

A todos os professores, funcionários do ICTA e demais amigos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Rafael Diniz Dallacort, pela ajuda, dedicação, carinho, compreensão, apoio incondicional e muito mais. A ele, só me resta agradecer todos os dias.

E por fim, a minha mãe Marieta da Silva e minhas tias (quase mães) Marina da Silva e Maria Ivone da Silva, pelo carinho, dedicação, apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu sucesso. A vocês, meus sinceros agradecimentos.

Avaliação da cinética de crescimento, resistência ácida e resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul e comparação com outros sorovares

Autor: Patrícia da Silva Malheiros

Orientador: Eduardo Cesar Tondo

RESUMO

No período de 1999 a 2002, uma linhagem de *Salmonella* Enteritidis esteve envolvida em mais de 90% das salmoneloses ocorridas no RS. Este trabalho teve por objetivo avaliar a cinética de crescimento, a resistência ácida e a resistência térmica dessa linhagem e compará-la com *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* não envolvidas em surtos alimentares, porém isoladas na mesma região. Em uma primeira etapa, a cinética de crescimento foi avaliada semeando-se cada sorovar em caldo nutriente (CN) e em salada de batata com maionese caseira (SMC), os quais foram mantidos a 30°C e 9,5°C. Em CN, a cinética de crescimento a 30°C foi semelhante para todos os sorovares, porém, em SMC a *S. Enteritidis* apresentou maior quantidade de células nas primeiras 6 horas de crescimento, sendo que somente depois de 12 horas todos os sorovares atingiram quantidades semelhantes de células. Em CN e em SMC, na temperatura de 9,5°C, não foi detectado crescimento de nenhum dos sorovares de *Salmonella* durante as primeiras 24 horas, sugerindo que essa temperatura foi suficiente para controlar a multiplicação desses microrganismos. Em uma segunda etapa, avaliou-se a resistência ácida e térmica dos diferentes sorovares de *Salmonella*. Para tanto, os três sorovares foram inoculados separadamente em CN e CN enriquecido com 1% de glicose (CNG), este último utilizado para produção de culturas ácido-adaptadas. Em seguida, os microrganismos foram submetidos a diferentes pH (3,5; 4,0 e 4,5) e temperaturas (52, 56 e 60°C). Os resultados demonstraram que a *S. Bredeney* apresentou maior resistência para os pH 3,5 e 4,0, porém a *S. Enteritidis* demonstrou maior capacidade de adaptação ácida do que *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*. Em pH 4,5 todos os sorovares, tanto não adaptados quanto ácido-adaptados, mantiveram a mesma quantidade de células viáveis durante 300 minutos. Quando expostas a 52°C, *S. Bredeney* apresentou maior resistência, entretanto somente a *S. Enteritidis* foi protegida com a adaptação ácida. Para 56 e 60°C, a *S. Enteritidis*, não adaptada e ácido-adaptada, apresentou maior resistência. A análise por SDS-PAGE demonstrou diferenças no perfil protéico de células não adaptadas e ácido-adaptadas para todos os sorovares testados. Com base nestes resultados, a capacidade de multiplicação mais rápida nas primeiras horas de cultivo em SMC, a maior capacidade de adaptação ácida e a maior resistência térmica demonstradas pela *S. Enteritidis* podem estar relacionadas ao freqüente envolvimento desse sorovar nas salmoneloses do RS.

Palavras-chave: *Salmonella*, Cinética de crescimento, Resistência ácida, Resistência térmica.

Growth kinetics, acid and thermal resistance of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks occurred in the Rio Grande do Sul State and comparison with other serovars

Author: Patrícia da Silva Malheiros

Advisor: Eduardo Cesar Tondo

ABSTRACT

During the period of 1999 to 2002, a strain of *Salmonella* Enteritidis was involved in more than 90 % of foodborne salmonellosis occurred in Rio Grande do Sul (RS) State. This work aimed to evaluate the growth kinetics, and the acid and the thermal resistance of this strain, comparing with *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*, which were not involved in foodborne outbreaks, but were isolated in the same region. In the first stage of this study, the growth kinetics was assessed. Each serovar was inoculated separately in nutrient broth (CN) and in potato salad prepared with homemade mayonnaise (SMC), and then incubated at 30 °C and 9.5 °C. In CN, at 30 °C, similar growing characteristics were found for all serovars, however in SMC *S. Enteritidis* demonstrated higher counts at the first 6 hours. Only after 12 hours of incubation, all serovars reached similar counts. In CN and in SMC, at 9.5 °C, during the first 24 hours, there was no detectable growth of any *Salmonella* serovar, suggesting that such temperature was adequate to control the multiplication of tested *Salmonella* serovars. In the second stage of the study, the acid and the thermal resistances of *Salmonella* serovars were evaluated. The three serovars were cultivated separately in Nutrient Broth and Nutrient Broth supplemented with 1 % glucose (NBG). The latter medium was used to induce acid-adapted cells. Then, the three serovars were exposed to different pH (3.5, 4.0, and 4.5) and temperatures (52, 56, and 60 °C). Results indicated that *S. Bredeney* presented higher resistance to pH 3.5 and 4.0, but *S. Enteritidis* presented a better capacity of acid adaptation than *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*. At pH 4.5, all serovars demonstrated a similar behavior, remaining at same levels of viable cells until 300 minutes. At 52 °C, *S. Bredeney* presented greater survivor rates, however acid adaptation protected only *S. Enteritidis*. At 56 °C and 60 °C, non-adapted and acid-adapted *S. Enteritidis* were more thermally resistant than other serovars tested. SDS-PAGE analysis demonstrated differences in protein profile of non-adapted and acid-adapted cells of all serovars. The capacity of rapid multiplication in the first hours of cultivation, the greater acid adaptation and thermal resistance presented by *S. Enteritidis*, may be related to the frequent involvement of this strain in salmonellosis cases in the RS.

Keywords: *Salmonella*, Growth kinetics, Acid resistance, Thermal resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS

AN: Ágar Nutriente
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ASP: Acid Shock Proteins
ATR: Acid Tolerance Response
BHI: Brain Heart Infusion
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CN: Caldo Nutriente
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
DVS: Divisão de Vigilância Sanitária
EUA: Estados Unidos da América
FDA: Food and Drug Administration
HCl: Ácido Clorídrico
HSP: Heat Shock Protein
HSR: Heat Shock Response
ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
LACEN/RS: Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul
LPS: Lipopolissacarídeos
RS: Rio Grande do Sul
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SMS: Salada de Batata com Maionese Caseira
SPI: *Salmonella* Pathogenicity Island
TTSS: Type III Secretion System
UFC: Unidade Formadora de Colônia
USDA: United States Department of Agriculture
XLD: Xylose Lysine Deoxycholate

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

FIGURA 1. Curva de crescimento, em CN, na temperatura de 30°C.....	41
FIGURA 2. Curva de crescimento, em CN, na temperatura de 9,5°C.....	42
FIGURA 3. Curva de crescimento, em salada de batata com maionese caseira, na temperatura de 30°C.....	43

Artigo 2

Fig 1. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) <i>Salmonella</i> Enteritidis (◆), <i>Salmonella</i> Typhimurium (■), <i>Salmonella</i> Bredeney (●) exposed to pH 3.5 in Nutrient Broth.....	60
Fig 2. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) <i>Salmonella</i> Enteritidis (◆), <i>Salmonella</i> Typhimurium (■), <i>Salmonella</i> Bredeney (●) exposed to pH 4.0 in Nutrient Broth.....	61
Fig 3. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) <i>Salmonella</i> Enteritidis (◆), <i>Salmonella</i> Typhimurium (■), <i>Salmonella</i> Bredeney (●) exposed to 52°C in Nutrient Broth.....	62
Fig 4. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) <i>Salmonella</i> Enteritidis (◆), <i>Salmonella</i> Typhimurium (■), <i>Salmonella</i> Bredeney (●) exposed to 56°C in Nutrient Broth.....	63
Fig 5. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) <i>Salmonella</i> Enteritidis (◆), <i>Salmonella</i> Typhimurium (■), <i>Salmonella</i> Bredeney (●) exposed to 60°C in Nutrient Broth.....	64
Fig 6. SDS-PAGE profiles of non-adapted and acid-adapted <i>Salmonella</i> serovars. .	65

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVO GERAL.....	12
1.2.1 Objetivos específicos.....	12
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.3.1 Características gerais da <i>Salmonella</i> e Salmonelose.....	13
1.3.2 Patogenicidade de <i>Salmonella</i>	14
1.3.3 Salmoneloses no Rio Grande do Sul.....	15
1.3.4 O sorovar <i>Salmonella</i> Enteritidis	16
1.3.5 Cinética de crescimento	19
1.3.6 Capacidade adaptativa.....	20
1.3.7 Resistência térmica e resistência ácida.....	22
1.3.8 Análise do perfil protéico por SDS-PAGE.....	25
CAPÍTULO 2	26
2.1 RESULTADOS	27
2.1 RESULTADOS	27
2.1.1 Artigo 1	27
2.1.1.1 Avaliação da cinética de crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares.....	27
2.1.2 Artigo 2	44
2.1.2.1 Acid and thermal resistance of a <i>Salmonella</i> Enteritidis strain involved in several foodborne outbreak compared to strain of other serovars	44
CAPÍTULO 3	66
3.1 DISCUSSÃO GERAL	67
REFERÊNCIAS.....	74

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas, sendo reconhecida como um dos principais agentes de infecção alimentar em todo o mundo. No Estado do Rio Grande do Sul (RS), a *Salmonella* tem sido reconhecida como o principal microrganismo responsável pelas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), nos últimos anos.

Embora diversos sorovares de *Salmonella* tenham sido encontrados em diferentes alimentos no RS, o sorovar *S. Enteritidis* tem sido identificado como o causador da grande maioria das salmoneloses alimentares investigadas pela Secretaria de Saúde do Estado, a partir de 1993. Com base no fato de que todos os sorovares de *Salmonella* são potencialmente patogênicos, o estudo das características que permitem que a *S. Enteritidis* provoque a maioria das salmoneloses humanas no RS, torna-se de grande interesse.

Trabalhos anteriores (GEIMBA et al., 2004; OLIVEIRA, 2005) apontaram que uma linhagem específica de *S. Enteritidis* esteve envolvida em mais de 90% das salmoneloses ocorridas no RS, de 1999 a 2002. Dentre as características que podem ter contribuído para isso, a habilidade de resposta efetiva a mudanças ambientais pode ter sido de grande importância para esse microrganismo. Uma hipótese é que linhagens patogênicas de *Salmonella* podem apresentar cinéticas de crescimento nos alimentos diferentes das linhagens não envolvidas em salmonelose. Além disso, linhagens patogênicas podem apresentar maior resistência ao estresse térmico e ácido ou maior capacidade de adaptação a condições adversas. Nesse sentido, um melhor entendimento sobre a cinética de crescimento, a resistência térmica e a resistência ácida da linhagem patogênica de *S. Enteritidis* e sua comparação com sorovares que não foram envolvidos em salmonelose no RS (*S. Typhimurium* e *S. Bredeney*), pode ser um passo importante na prevenção dessa doença.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética de crescimento, a resistência ácida e a resistência térmica de uma linhagem de *Salmonella* Enteritidis que apresenta o mesmo perfil genotípico dos microrganismos isolados nas salmoneloses ocorridas no RS, no período de 1999 a 2002, e compará-la com sorovares de *Salmonella* (*S. Typhimurium* e *S. Bredeney*) não envolvidos em surtos alimentares, mas isolados da mesma região.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a cinética de crescimento dos diferentes sorovares de *Salmonella* em meio de cultura e em salada de batata com maionese caseira.
- Avaliar e comparar a resistência ácida, com e sem adaptação ácida, dos diferentes sorovares de *Salmonella*.
- Avaliar e comparar a resistência térmica, com e sem adaptação ácida, dos diferentes sorovares de *Salmonella*.
- Comparar o perfil protéico dos diferentes sorovares de *Salmonella*, com e sem adaptação ácida.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características gerais da *Salmonella* e Salmonelose

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, que não fermentam lactose, sacarose ou salicina, porém, a glicose e outros monossacarídeos podem ser fermentados com produção de gás (KONEMAN et al., 1997; FORSYTHE, 2002). A maioria, com exceção da *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*, é móvel através de flagelos peritríquios (ANDREWS et al., 1992).

Atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em 3 espécies (*S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea*) e em mais de 2.463 sorovares (HEYNDRIKX et al., 2005). A espécie *S. enterica* agrupa as *Salmonella* associadas às infecções em humanos (principalmente gastroenterites) e animais de sangue quente, enquanto que as *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio e no ambiente (BARROW, 1999). Já as *S. subterranea* foram isoladas de superfícies sedimentares e apresentam 96,4% de similaridade com as *S. bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004). A classificação de *Salmonella* em sorovares baseia-se na composição de seus antígenos de superfície, os quais são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi) (KAUFFMAN, 1972; HEYNDRIKX et al., 2005).

Todos os sorovares de *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos, sendo o grau de virulência dependente da própria linhagem, do hospedeiro e do meio ambiente (BURR; JOSEPHSON; PEPPER, 1998).

As doenças causadas por esse microrganismo são conhecidas como salmonelose e podem ser divididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella Typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella Paratyphi* (tipos A, B e C) e as enterocolites, causadas pelos demais sorovares (JAY, 2005).

As enterocolites são uma das mais frequentes infecções de origem alimentar no mundo (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000). Os sintomas da infecção em humanos surgem de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado, embora períodos mais curtos e longos tenham sido relatados. O indivíduo infectado geralmente apresenta náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, dor de cabeça

e calafrios. Esses sintomas são geralmente acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias. Crianças menores de 1 ano e pessoas com mais de 60 anos são mais susceptíveis às manifestações da doença e tendem a apresentar uma infecção mais severa (JAY, 2005). A dose infectante de *Salmonella* é altamente variável. Embora se considere uma dose infectante típica para humanos de 10^6 - 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), diversos surtos de salmonelose foram relatados com doses muito menores (HUMPHREY, 2004). A quantidade exata varia de acordo com as linhagens, com o alimento veículo e com o estado fisiológico do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999).

1.3.2 Patogenicidade de *Salmonella*

Bactérias patogênicas, como a *Salmonella*, utilizam inúmeros mecanismos para causar doença no hospedeiro humano (OHL; MILLER, 2001).

As infecções causadas por esse gênero iniciam-se com a ingestão do microrganismo em água ou alimento contaminado. Após a ingestão, sobrevivendo ao pH estomacal, linhagens virulentas de *Salmonella* ligam-se à mucosa intestinal com ajuda de fímbrias adesivas. Logo em seguida, ocorre penetração da mucosa intestinal. Para isso, acreditava-se que o microrganismo utilizava como entrada, principalmente as células M e enterócitos de absorção (OHL; MILLER, 2001). Estudos atuais, no entanto, indicam que a entrada do microrganismo no intestino ocorre em diversas células do epitélio intestinal (ASTEN; KONINKX; DIJK, 2005). A bactéria liga-se ao enterócito através de fímbrias e induz rearranjos da actina dessas células, o que resulta na penetração da mucosa intestinal. Uma vez dentro do epitélio intestinal, polimorfonucleares fagocitam as *Salmonella*, porém os microrganismos permanecem viáveis dentro do fagossomo. A severidade da infecção e a permanência ou disseminação sistêmica dependerá da resistência do hospedeiro e virulência das linhagens (DARWIN; MILLER, 1999; JIMÉNEZ; CASTRO, 2003; JAY, 2005). Em seguida, inicia-se o processo de inflamação e a liberação de prostaglandinas, causando desequilíbrio eletrolítico, o que resulta em diarreia.

A *Salmonella* possui grupamentos de genes de virulência denominados Ilhas de Patogenicidade (SPI), as quais, acredita-se, tenham sido adquiridas de outras

espécies durante a evolução (transferência horizontal). Embora existam cinco SPI, duas delas são mais estudadas:

SPI 1: necessária para entrada da *Salmonella* na célula hospedeira. Codifica o Sistema de Secreção tipo 3 (TTSS), cuja função, provavelmente, seja a formação de um canal entre o interior e o exterior da membrana bacteriana, permitindo o transporte de proteínas diretamente do citoplasma da bactéria até o citoplasma da célula eucariótica.

SPI 2: necessária para permanência da *Salmonella* no ambiente intra-intestinal. Também codifica o TTSS (OHL; MILLER, 2001; HURLEY; MCCORMICK, 2003; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Além disso, o patógeno pode utilizar alguns mecanismos, contribuindo com a infecção, tais como a cápsula, cuja função é de proteção contra a fagocitose, os Lipopolissacarídeos (LPS), responsáveis pela indução de choque séptico, e a presença de fímbrias, as quais conferem aderência entre a bactéria e a célula do hospedeiro (WILSON et al., 2002).

1.3.3 Salmoneloses no Rio Grande do Sul

No Estado do Rio Grande do Sul, desde 1993, a salmonelose tem sido a Doença Transmitida por Alimentos (DTA) de maior ocorrência, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde (FEPPS/IPS/LACEN, 1999). Em vista disso, muitos alimentos têm sido pesquisados, objetivando identificar a origem e os veículos de transmissão das salmoneloses no Estado.

Costalunga e Tondo (2002) analisaram os surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul (RS), durante o período de 1997 a 1999, e demonstraram que os alimentos preparados com ovos crus sem inspeção, principalmente salada de batata com maionese caseira (42,45%), foram os principais responsáveis pelos surtos de salmonelose. Além disso, o maior número de surtos ocorreu na primavera, nos meses de outubro, novembro e dezembro, envolvendo principalmente pessoas na faixa etária de 16 a 50 anos. Nos surtos ocorridos nesse período, 8217 pessoas foram envolvidas, 2846 adoeceram e 1557 foram hospitalizadas, não sendo registrado óbitos.

No período de 2000 a 2001, a salada de batata com maionese caseira manteve-se com o principal veículo envolvido em salmoneloses no RS, alcançando

48,1% dos casos investigados pela Secretaria de Saúde deste Estado. Neste período, a população envolvida em salmoneloses foi de 14.253 pessoas expostas, 3400 doentes reais, 1938 foram hospitalizadas e dois óbitos foram registrados. A faixa etária mais atingida foi a de jovens e adultos com idades entre 20 e 49 anos, sendo que a maior ocorrência de surtos ocorreu entre a primavera e início do verão, principalmente em residências (61,5%) e estabelecimentos comerciais (13,7%) (SILVEIRA; TONDO, 2006). A utilização de matéria-prima sem inspeção sanitária, principalmente os ovos, e a manipulação inadequada dos alimentos, constituíram os principais fatores predisponentes em 73% dos surtos investigados no RS, em 2000 (NADVORNY et al., 2004).

1.3.4 O sorovar *Salmonella* Enteritidis

O gênero *Salmonella* apresenta mais de 2.463 sorovares reconhecidos (HEYNDRICKX et al., 2005), porém um sorovar específico, a *S. Enteritidis*, tem emergido como o principal responsável por surtos alimentares em diversos países, desde 1980 (RODRIGUE et al., 1990; STANLEY et al., 1992; LANDERAS et al., 1996; SCUDERI et al., 1996; NYLEN; FIELDER; PALMER, 1999; LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000).

Na Holanda, segundo dados do *Royal Institute of Veterinary Medicine*, a incidência de salmoneloses humanas causadas pela *S. Enteritidis* aumentou de 8,2 para 33,5%, entre 1988 e 1992 (PARRA, 1994). No sul da Itália, a *S. Enteritidis* emergiu como principal patógeno alimentar a partir da década de 90 (NASTASI; MAMMINA, 1996).

A *S. Enteritidis* foi responsável por duas grandes epidemias na Polônia. Uma ocorreu durante os anos de 1962 a 1976, acometendo principalmente crianças e disseminando-se pelo ambiente hospitalar e, a outra, que iniciou em 1980, estendeu-se além de 1994, envolvendo mais de 500.000 pessoas (GLÓSNICKA; KUNIKOWSKA, 1994).

Nos Estados Unidos (EUA), a *S. Enteritidis* foi disseminada na região da Nova Inglaterra, em 1979, na região do Meio Atlântico, em 1984 e na região do Pacífico, em 1993. Nestas regiões, a *S. Enteritidis* foi o sorovar mais frequentemente isolado, representando mais de 50% de todos os isolamentos de *Salmonella* reportados. O aumento na incidência de *S. Enteritidis* foi registrado na Califórnia, sendo que, em

1990 este sorovar representava apenas 11% das *Salmonella* isoladas, enquanto que em 1994 este valor aumentou para 37,6%. No ano de 1996, mais de 25% de todos os isolados de *S. Enteritidis*, dos Estados Unidos, foram provenientes da Califórnia (ÂNGULO; SWERDLOW, 1999). Neste país, a *S. Enteritidis* foi responsável por um grande surto ocorrido em 1994, envolvendo mais de 224.000 pessoas que consumiram sorvete contaminado em 41 estados (JAY, 2005).

Embora existam estados dos EUA onde a incidência de salmoneloses causadas pela *S. Enteritidis* ainda sejam altas, em geral, houve um decréscimo no índice de surtos associados a esse sorovar. No ano de 1994, a *S. Enteritidis* representava 26% de todos os sorovares isolados, já em 1999 esse valor decaiu para 16% (PATRICK et al., 2004). Segundo Patrick et al. (2004), esse decréscimo pode estar relacionado a programas de intervenção em toda a cadeia alimentar.

Ekdahl et al. (2004), a partir de dados do *Swedish Institute for Infections Disease Control* (SMI), investigaram a origem de salmoneloses associadas a viajantes, no período de 1997 a 2003, e observaram uma grande diferença geográfica na distribuição dos sorovares. Segundo este estudo, realizado em humanos, a *S. Enteritidis* foi extremamente dominante na Europa (mais de dois terços de todos os casos de salmoneloses foram causadas por esse sorovar), porém menos comum na África, Ásia e América, onde havia mais sorovares envolvidos. Apesar disso, a *S. Enteritidis* continuou prevalente em diversos países dos continentes acima citados.

No Brasil, um significativo aumento de *S. Enteritidis* foi detectado a partir de 1993, tornando-se, desde 1994, o sorovar de *Salmonella* mais freqüentemente isolado de casos de infecções humanas e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo (EDUARDO et al., 2006). Embora a subnotificação de surtos ainda seja um problema que afeta as estatísticas de DTA no Brasil, a *S. Enteritidis* tem sido apontada como o principal patógeno alimentar em vários Estados brasileiros. Segundo Solari et al. (1997), entre 5.686 amostras de *Salmonella* isoladas de aves em diferentes Estados (PI, GO, MG, MT, RJ, SP, PR, e RS), no período de 1992 a 1996, foram encontrados 58 sorovares, sendo que 61,7% dos isolados foram identificadas como *S. Enteritidis*.

Tavechio et al. (2002) sorotipificaram 4.581 linhagens de *Salmonella* de origem não-humana, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000, no Estado de São Paulo. Neste estudo, foram identificados 123 sorovares, sendo que a *S.*

Enteritidis foi a mais prevalente (32,7%). Neste período, o principal veículo envolvido em surtos alimentares foi a maionese caseira e o sorovar *S. Enteritidis* foi o mais frequentemente isolado dessa origem (95%).

Em um trabalho realizado por Alcocer et al. (2006) foram analisadas 25 amostras de *Salmonella* isoladas de carcaça de frango, no período de outubro de 1999 a março de 2000, no estado do Paraná. Dessas amostras, 18 foram sorotipificadas como *S. Enteritidis*.

O perfil epidemiológico de surtos alimentares causados pela *S. Enteritidis* também foi estudado na cidade de Blumenau, Estado de Santa Catarina. Durante o período de fevereiro de 1994 a junho de 1997, 96 surtos foram observados, 79 foram investigados, envolvendo 7802 pessoas com sinais e sintomas da infecção. Assim como no Rio Grande do Sul, o principal veículo alimentar para as *Salmonella* foi a maionese caseira (SANTOS; KUPEK, 2000).

No Estado do Rio Grande do Sul, segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde, em 1990, a *S. Typhimurium* foi isolada em 86% dos alimentos envolvidos em salmoneloses investigadas, enquanto que a *S. Enteritidis* não foi encontrada em nenhum alimento suspeito. Já no ano de 1993, este último sorovar foi isolado em 64% dos alimentos relacionados aos surtos, enquanto que a *S. Typhimurium* foi isolada em somente 4% dos alimentos investigados (FEPPS/IPS/LACEN, 1999). Outros dados a respeito do envolvimento do sorovar *S. Enteritidis* com as salmoneloses ocorridas no RS foram demonstrados recentemente e são demonstrados a seguir. Geimba et al. (2004) investigaram 75 isolados de *Salmonella* envolvidas em surtos de origem alimentar ocorridos no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2000, classificando 97% (73) desses microrganismos como *S. Enteritidis*. Oliveira (2005) demonstrou que o sorovar *S. Enteritidis* manteve-se como o principal causador de salmoneloses ocorridas no RS, no período de 2001 a 2002, quando 93% das linhagens de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em surtos pertenciam a esse sorovar. A predominância desse sorovar manteve-se no período de janeiro de 2003 a junho de 2006, quando, das 130 amostras analisadas, 114 (87,7%) foram sorotipificadas como *S. Enteritidis* (DE PAULA, 2006).

Embora a *S. Enteritidis* tenha sido frequentemente envolvida com as salmoneloses do RS nos últimos anos, outros sorovares têm sido encontrados em alimentos ou no ambiente de indústrias de alimentos. Como exemplo disso, Bessa, Costa e Cardoso (2004) demonstraram que os sorovares *S. Bredeney* e *S.*

Typhimurium foram isolados em 12% e 24,3% das 300 amostras de suínos analisadas. Castagna (2004) sorotipificou os isolados de *Salmonella* de 60 amostras de suínos portadores, encontrando 24,1% de *S. Bredeney* e 20,7% de *S. Typhimurium*. No mesmo estudo, foram isoladas 33,8% de *S. Bredeney* e 11,0% de *S. Typhimurium* em amostras de massa utilizadas na fabricação de embutidos tipo frescal. Entretanto, cabe ressaltar que não há registros do envolvimento do sorovar *S. Bredeney* em surtos alimentares no RS e a *S. Typhimurium* raramente tem sido envolvida com DTA atualmente, nesse Estado.

Foi sugerido que o aumento repentino no isolamento de *S. Enteritidis* pode ter sido um reflexo do sucesso das campanhas de erradicação das *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, causadoras do tifo aviário e da diarreia bacilar em frangos (BÄUMLER et al., 2000). Essas campanhas poderiam ter proporcionado a abertura de um novo nicho ecológico que vêm sendo ocupado, desde então, pela *S. Enteritidis*.

Apesar disso, as características fisiológicas que permitiram ao sorovar *S. Enteritidis* tornar-se o principal patógeno alimentar neste Estado e em diversos países ainda não estão completamente esclarecidas, ressaltando a importância da investigação desse microrganismo. Dentre os mecanismos que podem estar relacionadas com sua elevada virulência, podem ser destacados alguns fatores que merecem especial atenção, como por exemplo: a cinética de crescimento, a capacidade adaptativa a ambientes de estresse, a resistência térmica, a resistência ácida e a diferença no perfil protéico de uma linhagem representativa de *S. Enteritidis* em relação a outros sorovares que não foram provenientes de surtos alimentares, por exemplo, *S. Bredeney* e *S. Typhimurium*.

1.3.5 Cinética de crescimento

O estudo da cinética de crescimento de um microrganismo é de grande importância quando ele é submetido a diferentes condições como, por exemplo, aquelas que ocorrem em um alimento específico (PERNI; ANDREW; SHAMA, 2005). De forma geral, muitos microrganismos podem estar presentes em um alimento, contudo, freqüentemente, apenas poucos ou mesmo um só irá degradá-lo ou produzir um surto alimentar (JAY, 2005). Dentre as características que podem propiciar tal seleção, a velocidade de crescimento, assim como as características

das fases de crescimento desse microrganismo em alimentos específicos assumem um papel importante.

Parâmetros de crescimento de microrganismos como o número inicial de células, período da fase lag, número máximo de células e índice de crescimento específico máximo, têm sido utilizados para caracterizar modelos microbiológicos em alimentos (MANO; ORDONEZ; GARCIA, 2000; DEVLIEGHERE et al., 2001; JACXSENS; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2002) e meio de cultura (PIN; BARANYI, 1998; DEVLIEGHERE et al., 2001). Segundo Liu, Yang e Li (2006), os parâmetros de crescimento obtidos para cada microrganismo podem ser diferentes, justificando a importância do estudo da cinética de crescimento de linhagens específicas.

Segundo Humphrey et al. (1995), a fase de crescimento em que a *S. Enteritidis* se encontra influencia a sua destruição pelo calor e acidez. Atingindo a fase estacionária, o microrganismo torna-se mais resistente devido à diminuição da taxa metabólica.

Embora diversos sorovares de *Salmonella* possam estar presentes em alimentos, freqüentemente, é a *S. Enteritidis* que tem sido encontrada nos alimentos envolvidos em salmoneloses ocorridas no RS (GEIMBA et al., 2004). A cinética de crescimento da *S. Enteritidis* pode demonstrar características que a diferencie de outros sorovares, propiciando o seu destaque como patógeno alimentar no RS.

1.3.6 Capacidade adaptativa

As *Salmonella*, assim como outros microrganismos Enteropatogênicos, possuem uma surpreendente capacidade de sobreviver a condições rigorosas encontradas no ambiente natural e no organismo hospedeiro. A capacidade de adaptação e sobrevivência a estes estresses está diretamente relacionada à habilidade de alguns microrganismos em causar doenças (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

Humphrey (2004) reporta que as *Salmonella* apresentam um sistema regulatório complexo, o qual media sua resposta para o ambiente externo, podendo ser ativado sobre condições de estresse tais como o pH estomacal, o intestino humano, mudança de temperatura, baixo nível de oxigênio e água. Segundo este autor, um bom exemplo de cada regulação são os fatores sigma, os quais são reguladores globais que alteram a especificidade da RNA polimerase. Alguns fatores

sigma direcionam a transcrição para a produção de proteínas de estresse, as quais aumentam as possibilidades da bactéria sobreviver a mudanças ambientais.

A adaptação pode ser induzida tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária, promovendo, em ambas as situações, maior resistência à acidez letal e outros tipos de estresse. Na indução durante a fase exponencial, quando as células são expostas à pHs moderados (4,5 a 5,8), a sobrevivência a pH 3,0 pode aumentar 1000 vezes em relação a células não adaptadas. Em geral, essa proteção ocorre devido a uma série de proteínas de choque ácido (ASPs), as quais são induzidas durante a adaptação (60 ASPs, segundo análise de proteomas) (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

A indução na fase estacionária envolve diferentes proteínas regulatórias e ASPs. Neste caso, estima-se que 48 ASPs são induzidas (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). As *Salmonella* possuem, na fase estacionária, dois tipos de sistemas de resposta de tolerância ácida (ATR). Um deles é uma resposta induzida pela acidez, independente do fator sigma, e o outro dependente desse fator, o qual não requer indução ácida (LEE et al., 1995). A ATR induzida pelo ácido está associada a um aumento da proteína regulatória OmpR que é responsável pela expressão de proteínas de choque ácido, as quais protegerão a maquinaria celular contra a acidez letal (Foster, 2000). Ao contrário da ATR induzida pelo ácido, o fator sigma alternativo (σ^S), codificado pelo gene *rpoS* (HENGGE-ARONIS, 1996) é induzido automaticamente para resistência ao estresse geral. Quando as células entram em fase estacionária, aumenta a concentração de σ^S , estimulando a expressão de uma série de genes, chamados de regulon σ^S , cujo objetivo é proteger a célula de vários tipos de estresse (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001) tais como deficiência de nutrientes e condições ácidas (BEARSON et al., 1996). A resposta de tolerância ácida é altamente variável entre espécies (LIN et al., 1995) ou linhagens da mesma espécie (HUMPHREY et al., 1995; BUCHANAN; EDELSON, 1996; YUK; SCHNEIDER, 2006), em relação ao tipo de acidulante usado na adaptação ácida (BUCHANAN; EDELSON, 1999a) e quando se utiliza a fermentação da glicose, a qual reduz o pH gradualmente durante o cultivo (RYU; BEUCHAT, 1999). Entretanto, dentro de um mesmo experimento, torna-se possível a comparação entre sorovares, desde que submetidos às mesmas condições de cultivo e análises.

Muitos trabalhos têm sido realizados utilizando a fermentação da glicose para indução ácida (BUCHANAN; EDELSON, 1999b; WILDE et al., 2000; SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003; TETTEH; BEUCHAT, 2003). *Salmonella* crescendo até a fase estacionária em meio de cultura contendo 1% de glicose induz a ATR dependente do pH, aumentando sua sobrevivência para ácidos orgânicos; portanto, esse método é apropriado para produção de culturas ácido-adaptadas (SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003). Em um estudo realizado por Wilde et al. (2000) *Salmonella* Enteritidis PT4 demonstrou maior resistência térmica e ácida quando as culturas foram ácido-adaptadas em meio de cultura contendo glicose, porém essa adaptação não afetou a habilidade de sobrevivência das células em superfície seca com ar.

Existe a possibilidade de células ácido-adaptadas induzirem proteção cruzada contra estresses ambientais que podem ser encontrados durante o processamento de alimentos, incluindo sal, aquecimento (LEYER; JOHNSON, 1993; Tosun e Gönül, 2003), agentes ativos em superfície e lactoperoxidase (LEYER; JOHNSON, 1993). O fenômeno de proteção cruzada induzido pela acidez é pouco conhecido, mas pode estar relacionado à ativação de vários reguladores globais em resposta a mudanças no pH interno e externo. Exemplos incluem as proteínas regulatórias RpoS e Fur, tanto quanto dois componentes do sistema PhoPQ e OmpR/EnvZ, os quais regulam grupos de ASPs, contribuindo para a resistência ácida (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

A adaptação ácida, portanto, pode ser um importante mecanismo de sobrevivência de microrganismos em indústrias de alimentos, sendo que a sua avaliação pode ser útil para investigar a eficácia de métodos de conservação e de desinfecção. Um melhor entendimento sobre a adaptação ao estresse pode aumentar o conhecimento sobre microrganismos patogênicos específicos e como controlá-los, contribuindo com a segurança dos alimentos (LEYER; JOHNSON, 1992) e prevenção de doenças (TÖSUN; GÖNÜL, 2003).

1.3.7 Resistência térmica e resistência ácida

Vários tratamentos térmicos ou ácidos utilizados em nível doméstico ou pelas indústrias de alimentos são efetivos para a inativação de bactérias patogênicas de origem alimentar. Entretanto, existem sorovares de *Salmonella* que apresentam maior capacidade de sobrevivência às técnicas de processamento de alimentos, o

que pode resultar em surtos alimentares. Segundo alguns autores, há relação entre a resistência térmica e a resistência ácida em alguns sorovares de *Salmonella* (HUMPHREY et al., 1995; DOYLE; MAZZOTTA, 2000).

Isolados exibindo maior resistência ao calor e acidez podem apresentar aumento na capacidade de sobrevivência ao cozimento e condições estomacais. Células com tolerância térmica aumentada são mais capazes de sobreviver na presença de ácidos (HUMPHREY et al., 1995). A tolerância térmica e ácida em espécies patogênicas merece atenção especial devido à possibilidade do microrganismo passar pelo baixo pH estomacal, aumentando suas chances de estabelecer a infecção (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

Kanellos e Burriel (2005) reportaram que *S. Enteritidis* foi mais resistente ao ácido láctico do que *S. Typhimurium* e *S. Indiana*, confirmando que sorovares diferentes podem apresentar resistências diferentes.

De acordo com Humphrey et al. (1993), embora a resistência térmica e a resistência ácida de *Salmonella* possam ser aumentadas pela pré-exposição a altas temperaturas, os mecanismos envolvidos são diferentes. Neste estudo, uma cultura de *S. Enteritidis* incubada de 40 a 44°C mostrou-se mais resistente ao ácido (HCl, pH 2,6) do que uma cultura incubada de 46 a 47°C. Além disso, os autores inferiram que a tolerância ácida, neste caso, foi quase inteiramente independente da síntese protéica, sendo que os mecanismos envolvidos neste tipo de tolerância são desconhecidos. Em relação à resistência térmica, *S. Enteritidis* mostrou-se mais tolerante quando pré-exposta a temperaturas de 46 a 48°C, necessitando síntese de proteínas.

A temperatura ótima de crescimento da *Salmonella* é de aproximadamente 38°C, sendo que o mínimo observado foi em torno de 5,3 e 6,2°C, dependendo do sorovar. Temperaturas em torno de 45°C foram descritas como temperaturas-limite de crescimento (JAY, 2005). Como as *Salmonella* não formam esporos, são relativamente termo-sensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por alguns minutos (FORSYTHE, 2002). Contudo, a termo-resistência de *Salmonella* pode ser aumentada devido a alterações na acidez, atividade de água, flora acompanhante, alteração no conteúdo de sólidos totais, mudanças na formulação ou características dos alimentos ou condições de estocagem (DOYLE; MAZZOTTA, 2000).

Humpheson et al. (1998) investigaram a cinética de inativação térmica em *S. Enteritidis* PT4 entre temperaturas de 49 e 60°C, mostrando que uma alta densidade populacional (mais de 10⁷UFC/mL) na fase estacionária, a 60°C, gerou uma curva bifásica, ou seja, algumas células foram mais resistentes do que outras (subpopulação denominada “tail”), permanecendo viáveis por um período de tempo maior. Diminuindo a população celular para menos do que 10⁷UFC/mL, ou diminuindo a temperatura para menos de 51°C, a curva de sobrevivência tornou-se linear. A presença de células “tail” pode ser resultado da produção de proteínas de choque térmico (HSP) durante o aquecimento letal ou células capazes de produzir uma rápida resposta de choque térmico (HSR).

Comportamento celular semelhante, porém em relação à resistência ácida, foi observado quando *Salmonella* Enteritidis PT4 foi submetida a pH 2,6. Neste caso, durante os dois primeiros minutos de exposição o índice de morte foi relativamente baixo, porém, após este período inicial, a morte celular ocorreu muito rapidamente (HUMPHREY et al., 1995).

De modo geral, o pH ótimo de crescimento da *Salmonella* é próximo da neutralidade. O pH mínimo de crescimento foi registrado como 4,05 (com HCl e ácido cítrico), mas, dependendo do ácido utilizado para baixar o pH, o mínimo pode ser 5,5 (JAY, 2005). Para o crescimento e sobrevivência de *Salmonella* em condições ácidas é necessária a manutenção do pH intracelular em níveis relativamente constantes. Sabe-se que a homeostase do pH é uma função celular inata, porém os mecanismos de emergência para manter essa homeostase induzida pelo estresse ácido são desconhecidos (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001).

Gorden e Small (1993) definiram a resistência ácida como a percentagem de sobreviventes de um inóculo exposto a pH 2,5, por duas horas. Segundo estes autores, *Salmonella* são ácido-sensíveis, não resistindo a pH inferior a 3,0.

Muitos alimentos, como a maionese, dependem da acidificação para eliminar *Salmonella* e outros patógenos sensíveis (LEYER; JOHNSON, 1992). Pequenas contagens de *Salmonella* em maionese, mantida em pH abaixo de 4,0, são inativadas dentro de 24 horas (Jay, 2005). Perales e Garcia (1990) recomendam adicionar vinagre (6% de ácido acético) na maionese caseira, a fim de alcançar um pH de 3,4 a 4,0, mantendo-a por várias horas antes do consumo, para controlar a salmonelose. Contudo, cabe ressaltar que a maionese caseira tem sido

freqüentemente envolvida em surtos de salmonelose (COSTALUNGA; TONDO, 2002), mesmo que adicionada de vinagre.

1.3.8 Análise do perfil protéico por SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) é um método para separar proteínas, em um campo elétrico. Nessa técnica, um gel de poliacrilamida é utilizado como uma matriz inerte, através da qual as proteínas migram. Utiliza-se um detergente aniônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), para desnaturar as proteínas. Cada molécula de proteína se liga a várias moléculas do detergente carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando a voltagem é aplicada (ALBERTS et al., 1997).

Segundo Khan et al. (1996) linhagens bacterianas, crescendo em condições padronizadas, sempre produzirão o mesmo perfil protéico. Portanto, SDS-PAGE poderia ser utilizado para diferenciação entre clones, quando técnicas tradicionais como sorotipificação e fagotipificação falharem. Além disso, Rodrigues et al. (2004) reportaram que os perfis de proteínas totais obtidos por SDS-PAGE associados com análise numérica computadorizada, permitiram a obtenção de critérios adicionais para os estudos epidemiológicos e taxonômicos de *Candida albicans*.

Tetteh e Beuchat (2003) utilizaram SDS-PAGE para detectar diferenças no perfil protéico de *Shigella flexneri* ácido-adaptadas, que sofreram choque térmico (48°C) e que foram tratadas com cloranfenicol. Células bacterianas, quando expostas a diferentes ambientes sub-letais, induzem a síntese de proteínas específicas, características de cada tipo de estresse a qual é submetida (JENKINS; SCHULTZ; MATIN, 1988). Logo, o perfil proteico de células adaptadas deve ser diferente do perfil protéico de células não adaptadas, permitindo a investigação de proteínas produzidas durante a adaptação ao estresse. Nesse sentido, o gel de poliacrilamida-SDS tem sido apontado como o melhor procedimento para análise de proteínas, principalmente, por poder separar todos os tipos de proteínas, incluindo aquelas que são insolúveis em água. Além disso, como o método separa polipeptídeos de acordo com o seu tamanho, informações sobre a massa molecular e a posição de subunidades de qualquer complexo protéico também poderão ser obtidas (ALBERTS et al., 1997).

CAPÍTULO 2

2.1 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados na forma de artigos científicos. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um dos artigos com sua formatação de acordo com as orientações das revistas científicas escolhidas para a submissão.

2.1.1 Artigo 1

2.1.1.1 Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares

- Artigo submetido à revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares

Patrícia S. MALHEIROS, Cheila M. D. DE PAULA. Eduardo C. TONDO

RESUMO

No período de 1999 a 2002, uma linhagem geneticamente caracterizada de *Salmonella* Enteritidis esteve envolvida em mais de 90% das salmoneloses ocorridas no RS. Este trabalho teve por objetivo avaliar a cinética de crescimento dessa linhagem, comparando-a com o crescimento de *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* não envolvidas em surtos alimentares. Para tanto, cada sorovar foi semeado separadamente em caldo nutriente (CN) e em salada de batata com maionese caseira (SMC), os quais foram mantidos em 30°C e 9,5°C. Os resultados obtidos em laboratório foram comparados com os resultados modelados pelo Pathogen Modelling Program, USDA. Em CN, a cinética de crescimento a 30°C foi semelhante para todos os sorovares, os quais atingiram aproximadamente 8 log UFC/mL. Em SMC, a 30°C, a *S. Enteritidis* apresentou maior quantidade de células nas primeiras 6 horas de crescimento, sendo que somente depois de 12 horas todos os sorovares atingiram quantidades semelhantes de células, ou seja, aproximadamente 6 log UFC/g. Em CN e em SMC, na temperatura de 9,5°C, não foi detectado crescimento de nenhum dos sorovares de *Salmonella* durante as primeiras 24 horas, sugerindo que essa temperatura foi suficiente para controlar a multiplicação desses microrganismos. A modelagem bacteriana confirmou a maioria dos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Salmonella*, RS, cinética de crescimento, maionese caseira.

SUMMARY

Growth kinetics evaluation of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks occurred in the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil: a comparison with other serovars

During the period of 1999 to 2002, a genetically-characterized *Salmonella* Enteritidis was involved with more than 90 % of foodborne salmonellosis occurred in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. This work aimed to evaluate the growth kinetics of this strain, and compare with other *Salmonella* serovars (*S. Typhimurium* and *S. Bredeney*) growing characteristics, which were not involved in salmonellosis outbreaks. Each serovar was inoculated separately in nutrient broth (CN) and in potato salad prepared with homemade mayonnaise (SMC), and then incubated at 30 °C and 9.5 °C. Experimental results were compared with results obtained by the Pathogen Modelling Program, USDA. In CN, at 30 °C, similar growing characteristics were found to all serovars, reaching approximately 8 log CFU/ ml. In SMC, *S. Enteritidis* demonstrated higher counts at the first 6 hours, when cultivated at 30 °C. Only after 12 hours of incubation, all serovars reached similar counts (approximately 6 log CFU/g). In CN and in SMC at 9.5 °C, during the first 24 hours, there was no detectable growth of any serovar tested, suggesting that such temperature was adequate to control the multiplication of tested *Salmonella* serovars. Modelling results confirmed the majority of the results obtained experimentally.

Key words: *Salmonella*, RS, growth kinetics, homemade mayonnaise.

1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas, sendo reconhecida como um dos principais agentes de infecção alimentar em diversos países [22, 8, 25, 18, 13, 15]. No Rio Grande do Sul (RS), a *Salmonella* tem sido reconhecida como o principal microrganismo responsável por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) na última década [3, 26]. Embora diversos sorovares de *Salmonella* tenham sido encontrados em diferentes alimentos comercializados no RS, o sorovar *S. Enteritidis*

tem sido identificado como o causador da maioria das salmoneloses alimentares investigadas pela Secretaria de Saúde do Estado, nos últimos anos [6]. Esse sorovar também tem sido reconhecido como o principal patógeno alimentar, não apenas no RS, mas em outros Estados brasileiros como, por exemplo, Santa Catarina, Paraná e São Paulo [1, 20, 23, 27], destacando a sua importância.

Dentre os alimentos relacionados com as salmoneloses, as preparações à base de ovos têm recebido destaque, sendo que a maionese caseira foi o principal veículo de muitos surtos no RS. Como exemplo disso, COSTALUNGA, TONDO [3] analisaram as salmoneloses alimentares ocorridas no Rio Grande do Sul, durante o período de 1997 a 1999, e demonstraram que a maionese caseira foi responsável por 42,45% das salmoneloses. No período de 2000 a 2001, a maionese caseira continuou sendo freqüentemente envolvida nas salmoneloses do RS, alcançando 48,1% dos casos investigados oficialmente pela Secretaria de Saúde deste Estado [26]. A utilização de matéria-prima sem inspeção sanitária, principalmente os ovos e a manipulação inadequada dos alimentos constituíram os principais fatores predisponentes às salmoneloses em 73% dos surtos investigados no RS, em 2000 [17].

Apesar do consumo de maionese caseira não ser recomendado, muitas pessoas optam por consumi-la devido a suas características organolépticas [21] ou culturais. Uma vez que o principal ingrediente da maionese caseira é o ovo, e esse pode estar contaminado por *Salmonella* mesmo sem apresentar características perceptíveis [4, 10], cuidados rigorosos devem ser seguidos na preparação desse alimento. Fato importante a ser ressaltado é que muitas receitas de preparação de maioneses caseiras misturam ovos crus com ovos cozidos, possibilitando que um único ovo contaminado provoque a contaminação de todo o produto [24]. Apesar do sorovar *S. Enteritidis* ser frequentemente relacionado com ovos [10], ele não é o único sorovar de *Salmonella* encontrado nesse alimento. O maior envolvimento da *S. Enteritidis* com os casos de salmonelose veiculados pela maionese caseira pode estar relacionado não somente com sua prevalência em ovos, mas também com características que permitam maior eficiência de crescimento que demais sorovares.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a cinética de crescimento, em meio de cultura e em salada de batata com maionese caseira, de uma linhagem de *Salmonella* *Enteritidis* envolvida em diversas salmoneloses ocorridas no RS e

compara-la com parâmetros de crescimento de outros sorovares de *Salmonella* não isolados de surtos alimentares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas linhagens de *Salmonella enterica* de três sorovares distintos. Um dos sorovares foi de *S. Enteritidis* (linhagem SE86) isolado de repolho, em um surto de salmonelose ocorrido no Rio Grande do Sul, em 1999. Esse microrganismo foi caracterizado por métodos fenotípicos e genotípicos por GEIMBA [7] e apresentou o mesmo perfil genotípico das linhagens de *S. Enteritidis* envolvidas na maioria dos surtos de salmonelose ocorridas no período de 1999 a 2002, no Rio Grande do Sul [6, 19]. A SE86 foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba do Instituto de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS). As duas outras linhagens estudadas nesse trabalho foram de *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* isoladas, em 1999, a partir de fezes de aves e de um embutido, respectivamente. Esses sorovares foram escolhidos, uma vez que os registros da Vigilância Sanitária do RS demonstram pouco ou nenhum envolvimento deles com as salmoneloses deste Estado, nos últimos anos. Ambos os microrganismos foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Marisa de Itapema Cardoso, do Laboratório de Medicina Preventiva da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.2 Preparação do pré-inóculo e inóculo

Para obtenção do pré-inóculo, uma colônia isolada de cada sorovar foi semeada, separadamente, em caldo BHI (Biobrás), o qual foi mantido em estufa bacteriológica a 37°C, por 24 horas. Em seguida, 20µL de cada cultura, separadamente, foram semeadas em Caldo Nutriente (Synth) e então incubadas a 37°C, por 24 horas, para obtenção da cultura bacteriana fisiologicamente ativada.

2.3 Curva de crescimento em meio de cultura

A cultura de cada sorovar de *Salmonella* foi submetida a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (Vetec), resultando em um inóculo de

aproximadamente 10^2 UFC/mL de Caldo Nutriente (CN). O CN inoculado foi mantido em duas temperaturas distintas, 30°C e $9,5^\circ\text{C}$. A quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* foi quantificada pela técnica de gotas, segundo MILLES, MISRA [16]. O experimento foi realizado em duplicata e o limite de detecção do método de contagem foi, no mínimo, de 25 UFC/mL.

2.4 Curva de crescimento em salada de batata com maionese caseira (SMC)

Os ovos utilizados para a produção da maionese foram provenientes de um aviário onde foram testadas 100 aves para a presença de *Salmonella*, através de suabe cloacal. Cada suabe foi transferido para 10mL de água peptonada 0,1% estéril, transportados sob refrigeração até o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRGS e então testados para a presença de *Salmonella* pelo método descrito por FDA [5]. As aves foram testadas em um único momento e todas as amostras coletadas apresentaram ausência de *Salmonella*. Somente ovos sem rachaduras e contaminação fecal visível foram selecionados para os experimentos. No laboratório, os ovos foram imersos em álcool 70%, por 30 minutos, para descontaminação superficial. Logo após, foram quebrados assepticamente e as gemas colocadas em frasco estéril para preparação da emulsão [4].

Para a preparação da maionese caseira, uma gema cozida foi misturada a uma gema crua e, então adicionada de 60mL de óleo de soja até formar a emulsão. Nessa emulsão foram inoculadas aproximadamente 10^3 UFC/mL de cada sorovar de *Salmonella*, separadamente. Logo em seguida, cada emulsão foi adicionada a 200 gramas de batatas cozidas já resfriadas, a fim de atingir aproximadamente contagens iniciais de até 10 UFC/g de *Salmonella* em SMC. As SMC foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C ou em geladeira regulada para $9,5^\circ\text{C}$. Para o isolamento e quantificação de *Salmonella*, após cada um dos tempos de incubação, foram coletadas 10 gramas de SMC, as quais foram diluídas decimalmente em água peptonada 0,1%. Em seguida, 20 μL das diluições foram semeadas, em duplicata, em Ágar Nutriente (Merck) e em Ágar Seletivo XLD (Acumedia). As placas foram incubadas a 37°C , por 24 horas, sendo em seguida, as colônias típicas de *Salmonella*, quantificadas pela técnica de gotas. O experimento foi realizado em duplicata.

2.5 Modelagem bacteriana e comparação das curvas de crescimento

As curvas de crescimento em CN e em SMC foram comparadas com curvas de crescimento realizadas por modelagem bacteriana obtidas pelo Pathogen Modelling Program, do United States Department of Agriculture (USDA), versão 6.1.

Alguns parâmetros de crescimento dos microrganismos foram comparados entre as curvas obtidas por experimentação e por simulação. Dentre esses parâmetros, calculou-se o tempo médio de geração na fase exponencial de crescimento. A velocidade específica de crescimento foi calculada apenas com base nos dados experimentais, uma vez que o programa de modelagem não calcula essa variável. As equações para o cálculo das variáveis citadas estão abaixo descritas [14].

Tempo médio de geração (G):

$$G = \frac{t}{3,322 (\log N_f - \log N_i)} \quad (1)$$

Onde: t = tempo transcorrido (em minutos)

N_i = número inicial de células (em UFC/mL)

N_f = número final de células (em UFC/mL)

Velocidade específica de crescimento (μ):

$$\mu = \frac{2.303 (\log N_f - \log N_i)}{t} \quad (2)$$

Onde: t = tempo transcorrido (em minutos)

N_i = número inicial de células (em UFC/mL)

N_f = número final de células (em UFC/mL)

2.6 Análise estatística

As diferenças de crescimento foram analisadas com assistência do Núcleo de Estatística da UFRGS, utilizando o software SPSS versão 13.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cinética de crescimento em CN incubado a 30°C foi bastante semelhante para os três sorovares testados. Como demonstrado na *figura 1*, todas as linhagens permaneceram aproximadamente duas horas em fase lag, mesmo sendo provenientes de inóculos realizados em CN. A partir desse período, todos sorovares atingiram a fase exponencial de crescimento, a qual durou aproximadamente 12 horas, demonstrando tempo médio de geração e velocidade específica de crescimento semelhantes. Como exemplo disso, a *S. Typhimurium* e a *S. Bredeney* apresentaram tempo médio de geração (G) de 0,69 horas e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,44 log/h, enquanto que a *S. Enteritidis* apresentou G=0,71 horas e μ =0,42 log/h. Todos os sorovares testados atingiram a fase estacionária após 14 horas de cultivo, sendo que esta apresentou duração de pelo menos 48 horas. Os parâmetros de crescimento encontrados nestes experimentos foram comparados com o crescimento de *Salmonella* spp. modelado pelo programa Pathogen Modelling Program (USDA). Embora esse programa não especifique o tipo de meio de cultura utilizado para a simulação de crescimento desse microrganismo, o tempo de geração modelado ficou entre 0,4 e 0,6 horas, ou seja, menores do que os tempos médios de geração das linhagens testadas neste estudo, principalmente em relação a *S. Enteritidis*. Segundo a modelagem realizada, a duração média da fase lag foi de 3,1 horas e a população microbiana atingiu a fase estacionária (aproximadamente 10^8 UFC/mL) após 15 horas de cultivo.

Segundo HUMPHREY [11], a dose infectante de *Salmonella* para humanos saudáveis varia entre 10^6 e 10^8 UFC, embora tenham sido relatadas salmoneloses alimentares com doses muito menores. De acordo com o programa de modelagem, uma cultura de *Salmonella* de aproximadamente 2 log UFC/mL atingiria a dose infectante de 10^6 UFC/mL entre 7,1 e 13,5 horas. Neste estudo, *S. Typhimurium* atingiu essa dose em aproximadamente 9 horas, enquanto *S. Enteritidis* e *S. Bredeney*, em aproximadamente 8 horas.

Os experimentos conduzidos a 9,5°C, em CN, demonstraram que todos os sorovares permaneceram em fase lag pelo menos por 48 horas, sendo que neste período a *S. Bredeney* e a *S. Typhimurium* apresentaram cerca de 0,5 log UFC/mL a mais que *S. Enteritidis* (*figura 2*). Segundo JUNEJA, MARKS [12], quando as células passam por um tratamento térmico de controle microbiano, o período de fase lag é

aumentado, pois essas células precisam recuperar-se antes de entrar na fase exponencial. Além disso, os experimentos desses autores demonstraram que existe uma variabilidade de tempo para a fase lag de células injuriadas, mesmo sendo células de uma mesma população ou sofrendo o mesmo tratamento térmico. Segundo os parâmetros de crescimento modelados pelo Pathogen Modelling Program, a fase lag, a 10°C, teria duração de 37,2 a 90,8 horas (média de 58,1 horas), estando de acordo com os resultados obtidos para os microrganismos testados. O programa apresentou tempo de geração variando de 8,8 a 11,2 horas, sendo que o tempo necessário para atingir 10^6 UFC/mL foi de 175 a 239,8 horas.

Neste trabalho, as saladas de batata com maioneses caseiras (SMC) contaminadas com aproximadamente 1 log UFC/g de *S. Typhimurium*, *S. Bredeney* e *S. Enteritidis*, separadamente, foram mantidas a 30°C, por 24 horas, e os resultados das cinéticas de crescimento estão demonstradas na *figura 3*. Nesse alimento, observou-se que os sorovares testados permaneceram aproximadamente 2 horas em fase lag, assim como em CN (*figura 1*). A partir desse período, os isolados atingiram a fase exponencial de crescimento, a qual durou aproximadamente 16 horas. O tempo médio de geração e a velocidade específica de crescimento foram semelhantes para os sorovares testados, ou seja, *S. Typhimurium* apresentou $G=0,64$ horas e $\mu=0,47$ log/h, *S. Enteritidis* demonstrou $G=0,68$ horas e $\mu=0,44$ log/h, enquanto que a *S. Bredeney* demonstrou $G=0,66$ horas e $\mu=0,46$ log/h. Com base nos experimentos apresentados neste trabalho, os tempos médios de geração em SMC e em CN foram semelhantes. A maior inclinação da reta do CN, demonstrada na *figura 1*, pode ser justificada pelo maior número inicial de células.

Apesar dos três sorovares atingirem aproximadamente 10^8 UFC/g de SMC praticamente ao mesmo tempo (18 horas), em 6 horas de cultivo, a *S. Enteritidis* apresentou uma população de 5,84 log UFC/g, enquanto os sorovares *S. Bredeney* e *S. Typhimurium* apresentaram populações de 4,22 log UFC/g e 2,90 log UFC/g, respectivamente. As velocidades específicas de crescimento, nesse período, foram: $\mu=2,91$ log/h para *S. Enteritidis*, $\mu=2,11$ log/h para *S. Bredeney* e $\mu=1,44$ log/h para *S. Typhimurium*. O freqüente isolamento da *S. Enteritidis* a partir de ovos ou produtos avícolas [9] e a capacidade de multiplicação mais rápida desse sorovar nas primeiras horas de cultivo, em SMC, podem justificar o maior envolvimento da *S. Enteritidis* nos surtos do RS, envolvendo maionese caseira.

Embora o Pathogen Modelling Program não apresente parâmetros específicos para simulação de crescimento de *Salmonella* em SMC, nesse programa foram inseridos valores de pH (6,7) e nível inicial de células (aproximadamente 1 log UFC/g) semelhantes aos encontrados na SMC. O tempo de geração modelado para *Salmonella* foi menor do que aqueles encontrados para as linhagens testadas neste experimento, pois a modelagem demonstrou tempo de geração de 0,3 a 0,5 horas, enquanto os experimentos demonstraram tempos de geração de aproximadamente 0,66 horas. Segundo a modelagem bacteriana, o tempo necessário para uma população de 1 log UFC/g de *Salmonella* atingir uma dose infectante de 10^6 UFC, a 30°C, foi de 8,8 a 17,2 horas, enquanto que experimentalmente as *Salmonella* testadas atingiram essa quantidade em aproximadamente 10 a 12 horas.

Na temperatura de 9,5°C, em SMC, não foi detectado crescimento dos sorovares de *Salmonella* durante as 24 horas testadas. Resultados semelhantes foram demonstrados pelo programa de modelagem. Os resultados obtidos experimentalmente não foram demonstrados graficamente, uma vez que as quantidades de UFC/g permaneceram abaixo do nível de detecção da técnica. Embora a RDC 216/2004 da ANVISA determine que alimentos refrigerados, tais como a maionese caseira, devam ser conservados em temperaturas inferiores a 5°C, os resultados deste trabalho demonstraram que 9,5°C foi suficiente para o controle do crescimento de diferentes sorovares de *Salmonella*. Essa temperatura, ao contrário daquelas preconizadas pela ANVISA, pode ser mais facilmente atingida em serviços de alimentação.

CONCLUSÕES

A cinética de crescimento, em CN, foi semelhante para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney* em ambas as temperaturas testadas, 30°C e 9,5°C. A SMC, a 30°C, possibilitou o rápido crescimento dos diferentes sorovares de *Salmonella* testados, sendo que a *S. Enteritidis* desenvolveu-se com maior eficiência nas primeiras 6 horas. Esse fato pode ter contribuído com o maior envolvimento desse sorovar com as salmoneloses do RS, envolvendo maionese caseira. A temperatura de 9,5°C demonstrou ser adequada para conter a multiplicação dos sorovares de *Salmonella* testados.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dra. Mercedes Passos Geimba (PUC/RS) e Dra. Marisa Cardoso (UFRGS) por concederem as linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo. Ao núcleo de assistência estatística da UFRGS. A CAPES, pelo apoio financeiro. À Divisão de Vigilância Sanitária do RS e ao Laboratório Central (LACEN/RS) pela colaboração.

BIBLIOGRAFIA

[1] ALCOCER. I., et al. Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis serovar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 1-16, 2006.

[2] BRASIL. Resolução-RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVIA). Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, DF, 16 set. 2004.

[3] COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346, 2002.

[4] DE PAULA, C. M. D.; MARIOT, R. F.; TONDO, E. C. Thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis by boiling and frying egg methods. **Journal of Food Safety**, v. 25, p. 43-57, 2004.

[5] Food and drug administration (FDA). Bacteriological Analyses Manual, 7ª Edição, p. 51-69, AOAC, Internation, Arlington, 1992.

[6] GEIMBA, M. P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229-1233, 2004.

[7] GEIMBA. M. P., 2005. **Caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Salmonella* spp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul nos anos de 1999 a 2000.** Porto Alegre, 2005, 106p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

[8] GLÓSNICKA, R.; KUNIKOWSKA, D., The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 19-30, 1994.

[9] HUMPHREY, T. J. et al. The survival of salmonella in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. **Epidemiology and Infection**, v. 103, p. 35-45, 1989.

[10] HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: A Review. **International Journal of Food Microbiology**., v. 21, p. 31-40, 1994.

[11] HUMPHREY, T. J. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Science and Society**, v. 2, p. 504-509, 2004.

[12] JUNEJA V. K.; MARKS H. M. Growth kinetics of salmonella spp. pre- and pos-thermal treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 545-59, p. 2006.

[13] LACONHA I. et al. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155-165, 2000.

[14] LEMOS, W. P. C.; GERMANI, J. C.; RECH, S. B. **Manual de Laboratório de Tecnologia Bioquímica.** 2ª. edição. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 225p.

[15] LOPALCO, P. L. et al. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Ann Ig**, v. 12, p. 279-285, 2000.

[16] MILLES, A. A. L. e MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **J. Hyg.**, v.38, p. 732-749, 1938.

[17] NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S. SCHMIDT V. Ocorrência de *Salmonella* sp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Brasil, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.

[18] NASTASI. A.; MAMMINA, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype infections in southern Italy during the years 1980-1994. **Research in Microbiology**, v. 147, p. 393-403, 1996.

[19] OLIVEIRA, F. A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.** Porto Alegre, 2005, 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

[20] PERESI, J. T. M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, 1-13, 1998.

[21] ROADFORD, S. A.; BOARD, R. G. Review: fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. **Food Microbiology**, v. 10, p. 269-278, 1993.

[22] RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V. International in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 21-27, 1990.

[23] SANTOS, S. M.; KUPEK, E. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p. 275-278, 2000.

[24] SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 16, p. 93-99, 2002.

[25] SCUDERI G. et al. Foodborne outbreak caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 257-265, 1996.

[26] SILVEIRA, J. B.; TONDO, E. C. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA AND SALMONELLOSIS. **Epidemiology and Public Health**. 2006, Saint Malo, France, Sessão 5, Editora: Pierre Colin e Geneviève Clément, p. 521-522.

[27] TAVECHIO, A. T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman source in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**., V. 65, n. 6, p. 1041-1044, 2002.

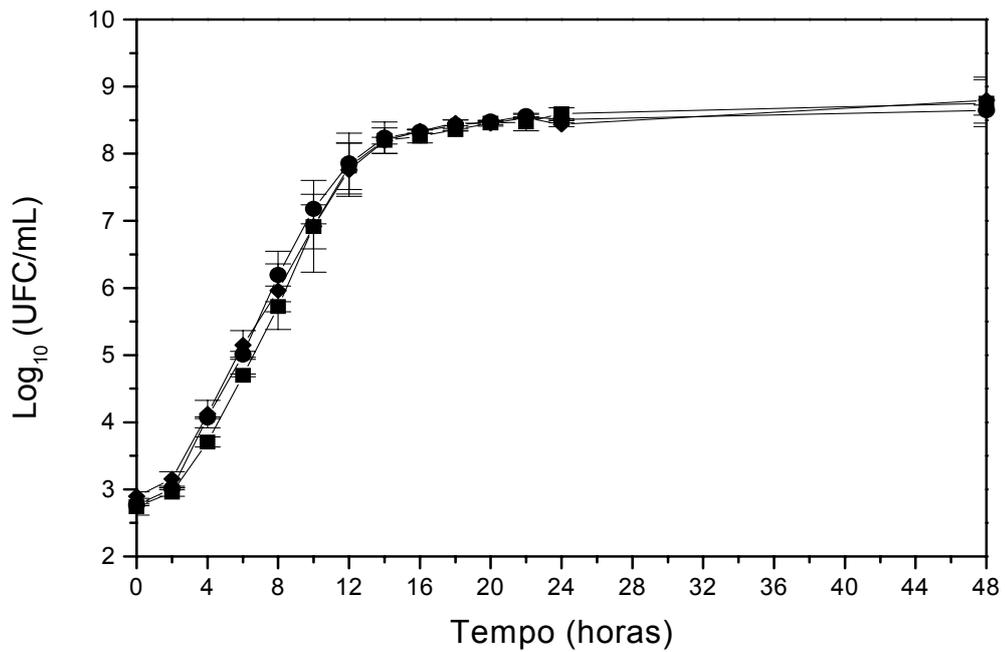


FIGURA 1. Curva de crescimento, em CN, na temperatura de 30°C. *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●). Cada ponto está representado pelo desvio padrão (n = 4).

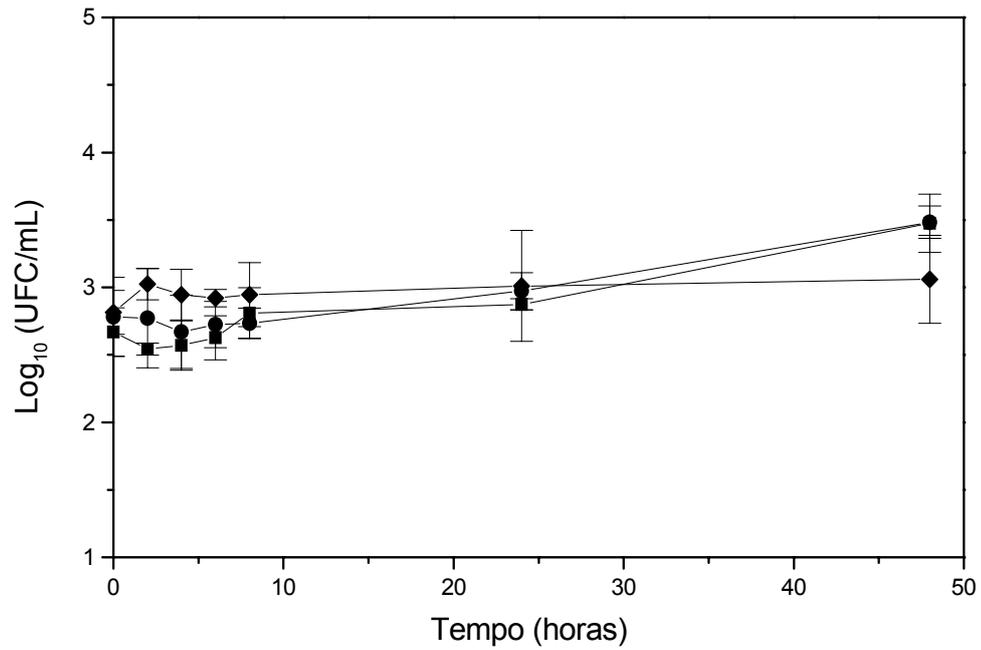


FIGURA 2. Curva de crescimento, em CN, na temperatura de 9,5°C. *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●). Cada ponto está representado pelo desvio padrão (n = 4).

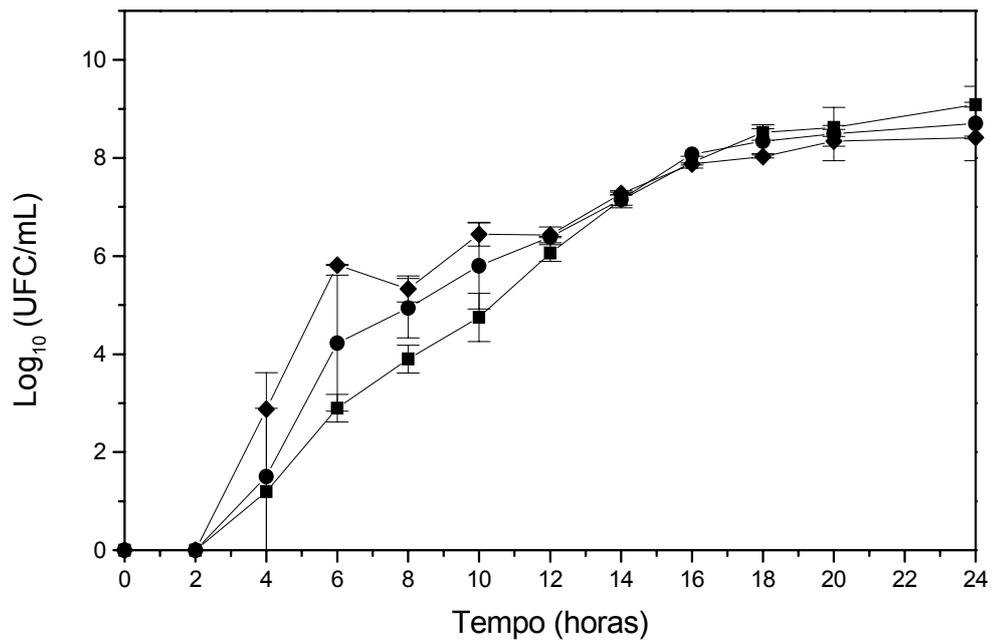


FIGURA 3. Curva de crescimento, em salada de batata com maionese caseira, na temperatura de 30°C. *Salmonella* Enteritidis (♦), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●). Cada ponto está representado pelo desvio padrão (n = 4).

2.1.2 Artigo 2

2.1.2.1 Acid and thermal resistance of a Salmonella Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks compared to strain of other serovars

- Artigo que será submetido à revista Food Microbiology.

Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks compared to strain of other serovars

P. S. Malheiros¹, A. Brandelli¹, C. P.Z. Noreña¹, E. C. Tondo^{1*}

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43212, Caixa Postal 15090, Cep 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: tondo@ufrgs.br

Abstract

The objective of this study was to compare the acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain SE86, involved in several foodborne outbreaks, with other two *Salmonella* serovars that were not associated with salmonellosis, but were isolated in the same region. The serovars were cultivated in Nutrient Broth and Nutrient Broth supplemented with 1% glucose, and then exposed to different pH (3.5, 4.0, and 4.5) and temperatures (52, 56, and 60 °C). Results indicated that *S. Enteritidis* presented stronger acid adaptation than *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* after exposure to pH 3.5 and 4.0. At pH 4.5, all serovars demonstrated a similar behavior, remaining at same levels of viable cells until 300 minutes of exposure. At 52 °C, non-adapted and acid-adapted *S. Bredeney* presented greater survivor rates when compared to the other serovars, even though acid adaptation protected *S. Enteritidis*. At 56 °C and 60 °C, non-adapted and acid-adapted *S. Enteritidis* were more thermally resistant than other serovars tested. SDS-PAGE analysis demonstrated differences in protein profile of non-adapted and acid-adapted cells of all serovars. The greater acid adaptation and thermal resistance demonstrated by *S. Enteritidis* could be related to the frequent involvement of this strain with salmonellosis in southern Brazil.

Keywords: thermal resistance, acid resistance, *Salmonella*, acid adaptation, protein profile.

1. Introduction

Salmonella spp. has been recognized as a common cause of foodborne gastroenteritis in humans (Lopalco et al., 2000; Tsen et al., 2000) and is also responsible for important economic losses in the food chain (Miyamoto et al., 1998; Humphrey, 2004). Although the genus *Salmonella* encompasses a large taxonomic group with over 2463 recognized serovars (Heyndrickx et al., 2005), salmonellosis caused by *Salmonella* Enteritidis have dramatically increased throughout the world (Rodrigue and Tauxe, 1990; Caffer and Eiguer, 1994; Scuderi et al., 1996; Laconha et al., 2000; Lopalco et al., 2000). In Brazil, a significant increase in the incidence of this serotype has been reported since the 90s (Peresi, et al., 1998; Santos and Kupek, 2000; Tavechio et al., 2002; Alcocer et al., 2006). Specifically, in the Rio Grande do Sul State (RS), southernmost state of Brazil, S. Enteritidis has been the main serotype isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in the last years (Geimba et al., 2004).

Various acid and heat treatments utilized in the food processing are generally effective to control and destroy vegetative *Salmonella* cells. However, some strains are able to survive such treatments, becoming potential hazards. In this regard, many studies have addressed the tolerance of *Salmonella* to different treatments (Wilde et al., 2000; Tosun and Gönül, 2003; Yuk and Schneider, 2006).

Treatment of foods with organic acids is effective in reducing populations and controlling the growth of many spoilage and pathogenic microorganisms (Tetteh and Beuchat, 2003). Due to its bactericidal and cell injuring activities, the use of acetic acid (AA) for decontamination of beef carcasses (Anderson et al., 1998) and fresh products (Beuchat, 1998) has been previously reported. However, microorganisms may adapt and become resistant after exposure to sub-lethal acid concentration.

Acid adaptation appears to be more effective for cells in the stationary phase under mild acidic condition (Samelis et al., 2003). This adaptation can provide a cross-protection to *Salmonella* against various environmental stresses during food processing like high temperatures (Leyer and Johnson, 1993; Buchanan and Edelson, 1999a) and acidity (Buchanan and Edelson, 1999b). It is widely accepted that the ability to adaptation and survive harsh conditions encountered in the natural

environment or food industry is directly related to their disease causing abilities (Audia et al., 2001). As the stomach with its acid pH is recognized as the first line of defense against foodborne pathogens, acid resistance of pathogens may contribute to their virulence (Berk et al., 2005).

Bacterial cells respond to various stresses by inducing the synthesis of specific proteins (Jenkins et al., 1998). The induction of stress proteins upon exposure to sub-lethal conditions has been shown to confer protection against subsequent exposure to the unrelated stresses (Tetteh and Beuchat, 2003).

Despite many *Salmonella* serotypes have been found in different food products in RS, only *S. Enteritidis* has been actually linked with foodborne salmonellosis. Therefore, the understanding of the specific characteristics of this pathogen assumes great importance. Based on this, acid and thermal resistance could be among the factors contributing with the involvement in foodborne outbreaks. The present study aimed to compare the acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved with several foodborne outbreaks occurred in the southern Brazil with other *Salmonella* serovars that were not associated with foodborne salmonellosis, but were isolated in this same region.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Three serovars of *Salmonella* were used in this study. *Salmonella* Enteritidis (SE86) was isolated from a cabbage involved in a foodborne outbreak occurred in 1999, in RS. This strain was obtained from Prof. Dr. Mercedes Passos Geimba, from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS) and shows the same genotypic profile of more than 90% of *S. Enteritidis* involved in foodborne salmonellosis occurred in RS, 1999 to 2002. The other serovars used in this study, *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*, were isolated in 1999 from pig feces and from a sausage, respectively, both were not involved with foodborne outbreaks. These strains were obtained from Prof. Dr. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, from Preventive Veterinary Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). All strains were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50% glycerol. They were activated

by transferring 20 μ l of stock culture to 3 ml of Brain Heart Infusion broth (BHI) (Biobras, Belo Horizonte, Brazil). Working cultures were kept at 4 $^{\circ}$ C on Nutrient Agar (NA) (Merck, Darmstadt, Germany). Strains were revived by inoculating 3 ml of BHI and incubating for 24 h at 37 $^{\circ}$ C.

2.2. Acid adaptation

For acid adaptation, strains were cultivated in Nutrient Broth supplemented with 1% glucose (Merck) (NBG). The cultures were maintained for 18 h at 37 $^{\circ}$ C in static condition according to Tetteh and Beuchat (2003). After 18 hours of incubation, the culture pH was measured using a pH meter model PHS-3B (PHTEK). Each strain was also incubated in Nutrient broth (NB) (Synth, São Paulo, Brazil) without glucose, at the same conditions, to produce non-adapted *Salmonella* cells.

2.3. Determination of acid resistance

Portions of 1.0 ml (approximately 8.0 log CFU/ml) of the acid-adapted and non-adapted cultures were transferred to erlenmeyers flasks containing 99 ml of NB acidified to pH 3.5, 4.0 or 4.5 with 12.28 M acetic acid. Cultures were incubated at 30 $^{\circ}$ C for different periods according the pH tested and aliquots of 1 ml were taken and serially diluted in 9 ml of 0.1% peptone water (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). After vigorous vortexing, 20 μ l of appropriate dilution were plated on BHI agar (Merck) and incubated for 24 h at 37 $^{\circ}$ C. The quantification of survivors was performed according to the technique described by Milles and Misra (1938). The lowest detection limit of acid survivors was 1.0 log CFU/ml, and each experiment was carried out two times, with duplicate counts.

2.4. Determination of thermal resistance

Portions of 1.0 ml (approximately 8.0 log CFU/ml) of the acid-adapted and non-adapted cultures were transferred to erlenmeyers flasks containing 99 ml of pre-warmed NB kept in a water bath (Schott CT 52). The flasks were incubated at temperatures of 52, 56, and 60 $^{\circ}$ C, according Humpheson et al. (1998). The

survivors quantification was evaluated as described in 2.3. Each experiment was carried out three times, with duplicate counts.

2.5. SDS-PAGE analysis

SDS-PAGE was performed essentially as described by Khan et al. (2003) to investigate proteins related with acid adaptation of *Salmonella*. Briefly, samples (1 mL) of acid-adapted and non-adapted cultures were centrifuged at 8000 x g for 5 min. Cells were washed with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS), and centrifuged at 8000 x g for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 50 µl of sample buffer (1 ml of 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.8 ml of Glycerol, 0.4 ml of β-Mercaptoetanol, 1.6 ml of SDS 10%, 0.4 ml of Bromofenol blue 1%, and 3.8 ml of distilled water) kept at 4 °C. The suspensions were then boiled for 10 min and centrifuged at 10.000 x g for 3 min. The protein concentration in extracts was estimated by folin phenol reagent method (Lowry et al., 1951). Approximately 80 µg of the samples were loaded in each lane and analyzed by SDS-PAGE with resolving gel concentration at 12%. Separation of proteins was done at 25 mA when proteins were moving through the stacking gel and then at 20 mA for the rest of the run. The proteins were visualized by staining the gel with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). The gel was kept in the staining solution overnight and subsequently destained.

2.6. Statistical analysis

The line of best fit for survivor plots was determined by linear regression using the software SPSS 13. All data were analyzed by 95% confidence level.

3. Results

3.1 pH reduction during acid-adaptation

The glucose fermentation by *Salmonella* growing in NBG resulted in pH decrease, and this was used to achieve acid adaptation. *Salmonella* grown in NBG was considered acid-adapted, while *Salmonella* cultivated in NB was considered

non-adapted. Before inoculum, the initial pH values of NBG were 6.50 ± 0.02 and, after *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, and *S. Bredeney* cultures, the final pH values were 4.47 ± 0.03 , 4.39 ± 0.02 , and 4.34 ± 0.05 , respectively. The pH of NB before and after inoculum was approximately 6.80.

3.2 Acid resistance

Initial populations of approximately 7 log (CFU/ml) of non-adapted *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* were completely inactivated after 60 and 90 minutes, respectively, in NB acidified to pH 3.5. However, only 4 log reduction of *S. Bredeney* was observed at 210 minutes, in the same conditions (Fig. 1A). After acid adaptation, *Salmonella* serovars showed different survival rates, as can be seen in Fig. 1B. Even though *S. Bredeney* remained the serovar presenting the lower inactivation rates at pH 3.5, *S. Enteritidis* showed higher acid adaptation capacity when compared with the other serovars. A 6 log reduction of acid-adapted *S. Typhimurium* was observed at 180 minutes at pH 3.5, while only 2 and 1 log reductions of acid-adapted *S. Enteritidis* and acid-adapted *S. Bredeney*, respectively, were observed at 210 minutes, at the same pH (Fig. 1). Corroborating these results, the D (pH 3.5) values for non-adapted and acid-adapted *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* were 15.08 and 36.57 minutes and, 49.37 and 205.34 minutes, respectively. For non-adapted *S. Enteritidis* the D (pH 3.5) value was 13.93 and after acid adaptation it was 96.36 minutes. Based on these results, D (pH 3.5) value for *S. Typhimurium* increased almost 2 fold, D (pH 3.5) values for *S. Bredeney* increased approximately 4 fold, and while for *S. Enteritidis* D (pH 3.5) values increased almost 7 fold.

Non-adapted *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* presented approximately 1 log and 1.6 log reductions, respectively, in NB acidified to pH 4.0, while *S. Bredeney* remained at almost same levels of cells (Fig. 2A). The D (pH 4.0) value for non-adapted *S. Typhimurium* was 215.56 minutes, and for non-adapted *S. Enteritidis* was 125.41 minutes. Counts of acid-adapted strains were not reduced during 210 minutes of exposure at pH 4.0 (Fig. 2B).

At pH 4.5, the number of acid-adapted or non-adapted cells remained nearly constant for all serovars tested (data not shown).

3.3 Thermal resistance

Acid adaptation did not influence the behavior of *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* at 52°C (Fig. 3). Initial populations of approximately 6 – 7 log of non-adapted and acid-adapted *S. Typhimurium* were completely inactivated in 180 minutes, while approximately 4.0 log reductions of non-adapted and acid-adapted *S. Bredeney* were observed at 300 minutes of exposure. The D (52°C) values for non-adapted and acid-adapted *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* were 23.55 and 25.83 minutes, and, 59.19 and 72.30 minutes, respectively. On the other hand, acid-adapted *S. Enteritidis* were protected from thermal inactivation compared to non-adapted cells. Non-adapted cells were inactivated in 180 minutes, and it was necessary 300 minutes to completely inactivate acid-adapted *S. Enteritidis* (Fig. 3A and 3B). Confirming adaptation, D (52°C) values for non-adapted and acid-adapted *S. Enteritidis* were 38.31 and 51.98 minutes, respectively.

In general, acid-adapted cells of *Salmonella* serovars were more thermally tolerant than non-adapted cells at 56°C (Fig. 4). Non-adapted *S. Typhimurium* population was completely inactivated at 20 minutes of exposure, but acid-adapted cells remained with numbers of 2.5 log at the same time. The complete inactivation happened only at 30 minutes of exposure. In the same way, non-adapted populations of *S. Enteritidis* and *S. Bredeney* died off in 30 and 25 minutes, respectively. However, 3 log acid-adapted cells of both serovars were recovered at 30 minutes. D (56°C) values for non-adapted and acid-adapted cells were, respectively, 2.84 and 4.81 minutes (*S. Typhimurium*), 5.23 and 7.79 minutes (*S. Enteritidis*), 3.82 and 6.99 minutes (*S. Bredeney*).

At 56°C and 60°C, acid-adapted and non-adapted *S. Enteritidis* were more thermally resistant than other serovars tested (Fig. 4 and Fig. 5). At 60°C, the population of non-adapted *S. Enteritidis* was completely reduced in 15 minutes, while the populations of non-adapted *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* were completely inactivated in 5 and 10 minutes, respectively (Fig. 5A). Acid-adapted *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Bredeney* were completely inactivated in 20, 10, and 10 minutes at 60°C, respectively (Fig. 5B).

3.4 Protein analyses

SDS-PAGE was used to detect proteins produced by non-adapted and acid-adapted *Salmonella* serotypes and to estimate their molecular weights (Fig. 6). Changes in the protein profile of non-adapted and acid-adapted *Salmonella* were observed. In all acid-adapted serovars an intensification of bands between 60 and 120 KDa was observed. In acid-adapted *S. Enteritidis* and in acid-adapted *S. Bredeney* bands between 25 and 50 KDa became less intense.

4. Discussion

It has been previously demonstrated that supplementation of culture broth with 1% glucose is a suitable and practical method for producing acid adapted, stationary-phase cells of *Salmonella* serovars (Buchanan and Edelson 1996; Samelis et al., 2003; Tetteh and Beuchat, 2003). Acid adaptation by the glucose method may be considered more realistic than acid shock because microorganisms in food are frequently in stationary phase under nutrient deprivation (Rees et al., 1995).

The results of the present study were consistent with other investigations, indicating that all serovars adapted in NBG present greater acid resistance when exposed to pH 3.5 and 4.0. These results are similar to those observed by Tetteh and Beuchat (2003), who reported that acid-adapted *Shigella flexneri* cells were more resistant for acetic acid than non-adapted cells.

In this research, non-adapted *S. Bredeney* presented more resistance than *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* when exposed to pH 3.5 and 4.0. However, after acid adaptation, *S. Enteritidis* presented similar survivor rates of *S. Bredeney*, demonstrating an expressive acid adaptation capacity. Even though acid adaptation was also observed in *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*, it was not as intense as acid-adaptation presented by *S. Enteritidis*. The D values confirmed such results.

Many studies have used hydrochloric acid (HCl) to investigate acid resistance of *Salmonella* serovars (Foster and Hall, 1990; Foster, 1991; Tosun and Gönül, 2003). In the present study, was used acetic acid instead HCl, because this organic acid is naturally formed or a commonly added preservative in foods (Samelis et al., 2003). As an example, in the state of RS in southern Brazil, home-made mayonnaise is commonly made by adding different doses of vinegar (acetic

acid). Since this food has been considered the vehicle most involved with Salmonellosis in this region (Costalunga and Tondo, 2002; Silveira and Tondo, 2006), acetic acid present in home-made mayonnaise could promote acid adaptation and be related with the frequent involvement of *S. Enteritidis* with the outbreaks.

In the present study, all the *Salmonella* serovars presented acid adaptation after exposure to gradual decreased pH, during glucose fermentation. Other researchers also have demonstrated acid adaptation of *Salmonella*. Leyer and Johnson (1992) have found that acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese and *S. Typhimurium* adapted with HCl pH 5.8 was more resistant for lactic, propionic and acetic acid (pH 3.85) than control cells. Tosun and Gönül (2003) have demonstrated that *S. Typhimurium* acid adapted in HCl pH 5.8 was dramatically protected from acid death (HCl, pH 3.45) compared to non-adapted cells.

The capacity for acid adaptation showed by *Salmonella* serovars seems to be related with a series of acid shock proteins (ASPs) induced during acid adaptation. According to Audia et al. (2001), during stationary and log phases, cultures produce different sets of ASPs and regulatory proteins. Proteomic analyses indicated that 60 and 48 ASPs were induced in log and stationary phases respectively, in *S. Typhimurium* cells, subjected to acid shock. In the present work, the whole-cell proteins profile performed by SDS-PAGE demonstrated difference between non-adapted and acid-adapted *Salmonella*. However, the major differences were observed in the intensities of bands. Overall, non-adapted cells presented less intense bands than acid adapted cells, but also different bands were found after adaptation. Tetteh and Beuchat (2003) did not find differences between protein banding profile of non-adapted and heat-shocked *Shigella flexneri*. Nevertheless, acid-adapted cells presented more proteins than other three types of cells, i. e. non adapted control, heat-shocked cells, and chloramphenicol treated cells.

In this study, non-adapted and acid-adapted *S. Bredeney* showed to be more resistant at 52 °C than *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. The acid adaptation of *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* did not influence its thermal resistance, in opposite to what happened to *S. Enteritidis*. The thermal resistance at 52 °C was significantly ($P < 0.05$) increased after acid-adaptation of this serovar. Wilde et al. (2000)

observed that heat tolerance can be induced by fermentative growth in NBG. The D (52 °C) values for two non-adapted *S. Enteritidis* RpoS-positive strains were 26 and 21 minutes, while the same strains, after adaptation, presented D (52 °C) values of 89 and 60 minutes. In our work, the D (52 °C) value for non-adapted *S. Enteritidis* was 38.31 minutes, and for acid-adapted *S. Enteritidis* it was 51.98 minutes.

At 56 and 60 °C, non-adapted and acid-adapted *S. Enteritidis* showed to be more resistant than *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*. In this work, at 56 °C, non-adapted *S. Enteritidis* was completely inactivated in 30 minutes, but at this time acid-adapted *S. Enteritidis* showed population of 2.8 log. Similar reduction rates were demonstrated by Humpheson et al. (1998) for non-adapted *S. Enteritidis*. These authors showed that initial populations of approximately 10 log were inactivated between 30-40 minutes.

At 60°C, acid adaptation increased ($P<0.05$) the thermal resistance of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, but not of *S. Bredeney*. Non-adapted *S. Enteritidis* was inactivated in 15 minutes and acid adapted *S. Enteritidis* died off in 20 minutes. Other study has shown different thermal resistance of *S. Enteritidis*, at 60°C (Humpheson et al., 1998). These researchers have presented that initial populations of 5 log of *S. Enteritidis* were inactivated in only 5 minutes.

According to Samelis et al. (2003), overall, bacterial pathogens that may be present in foods containing glucose or other fermentable carbohydrate may grow at the expense of these compounds to become acid-adapted, temperature and other environmental (storage) conditions permitting. Acid adaptation therefore appears to be an important aspect of cell survival (Leyer and Johnson, 1992), and can affect heat resistance, as demonstrated by our results. Furthermore, considering that temperatures of > 60 °C are recommended to conserve foods in self services restaurants according to the Brazilian Federal regulation 216/2004 – ANVISA, and frequently ready-to-eat food are exposed to abuses of time and temperature standards, the thermal resistance of pathogen microorganisms could assume a remarkable importance in the foodborne outbreaks. Information on the target pathogen's thermal resistance is an important step towards the optimization of the food thermal processes. Under-estimation of thermal resistance increases the risk that a sufficient portion of an initial pathogen population may persist after thermal treatments, being possible to result in a foodborne outbreak. Based on the results observed in this study, the better acid adaptation and thermal resistance observed

for *S. Enteritidis* SE86 could be related with its frequent involvement in foodborne Salmonellosis occurred in RS, in the last decade.

Acknowledgements

Authors thank Dr. M. P. Geimba (PUC/RS) and Dr. M. R. I. Cardoso (UFRGS) for kindly given bacterial strain. This work was supported, in part, by the CAPES, Brazil.

References

Alcocer. I., De Oliveira, K.M.P., Vidotto. M.C., Oliveira, T.C.R.M., 2006. Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis serovar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26, 1-16.

Audia, J.P., Webb, C.C., Foster, J.W., 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 97-106.

Anderson, M.E., Huff, H.E., Naumann, H.D, Marshall, R.T., 1998. Counts of six types of bacteria on lamb carcasses dipped or sprayed with acetic acid at 25⁰C or 55⁰C and stored vacuum packaged at 0⁰C. *J. Food Protec.* 51, 874-877.

Berk, P.A., Jonge, R., Zwietering, M.H., Abee, T., Kieboom, J., 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *J. Appl. Microbiol.* 99, 859-866.

Beuchat , L.R., 1998., Surface Decontamination of Frit and Vegetables Eaten Raw: A review. Geneva: Food Safety Unit, World Health Organization, WHO/FSF/FOS/982.

Brasil. Resolução-RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). Dispõe sobre Regulamento Técnico de

Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União, DF, 16 set. 2004.

Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *App. Environ. Microbiol.* 62, 4009-4013.

Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1999a. Effect of pH-dependent, stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16, 447-4458.

Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1999b. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J. Food Protec.* 62, 211-218.

Caffer, M.I., Eiguer, T., 1994. *Salmonella enteritidis* in Argentina. *Int. J. Food. Microbiol.* 21, 15-19.

Costalunga, S., Tondo, E.C., 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. *Braz. J. Microbiol.* 33, 342-346.

Foster, J.W., Hall, H.K., 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771-778.

Foster, J. W., 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* 173, 6896-6902.

Geimba, M.P., Tondo, E.C., Oliveira, F.A., Canal, C.W., Brandelli, A., 2004. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J. Food Protec.* 67, 1229-1233.

Heyndrickx, M., Pasmans, F., Ducatelle, R., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. *Vet. J.* 170, 275-277.

Humpheson L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B., 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 459-464.

Humphrey, T.J., 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Sci. Soc.* 2, 504-509.

Jenkins, D.E., Schultz, J.E., Matin, A., 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 3910-3914.

Khan I.A., Rattan A., Fatima, T., Khan F.G., Kalia, A., 1996. Application of whole cell protein analyses by SDS PAGE to establish the source of *Salmonella typhimurium*. *J. Infect.* 33, 169-171.

Laconha I., Baggesen, D.L., Rementeria, A., Garaizar, J., 2000. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet. Microbiol.* 75, 155-165.

Leyer, G.J., Johnson E.A., 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *App. Environ. Microbiol.* 58, 2075-2080.

Leyer, G.J., Jonson, E.A., 1993. Acid adaptation induces cross protection again environment stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1842-1847.

Lopalco, P.L., Germinario, C., Di Martino, V., Frisoli, L., Pagano, A., Quarto, M., Barbuti, S., 2000. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Ann Ig.* 12, 279-285.

Lowry, O.H., Rosebough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Milles, A.A.L., Misra, S.S., 1938. The estimation of the bacterial power of the blood. *J. Hyg.* 38, 732-749.

Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., Arakawa, A., 1998. *Salmonella* penetration through egg shell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J. Food. Protec.* 61, 350-353.

Peresi, J.T.M., Almeida, I.A.Z.C., Lima, S.I., Marques, D.F., Rodrigues, E.C.A., Fernandes, S.A., Gelli, D.S., Irino, K., 1998. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *J. Pub. Health.* 32, 1-13.

Rees, C.E.D., Dodd, C.E.R, Gibson, P.T., Booth, I.R., Stewart, G.S.A.B., 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 263-275.

Rodrigue, D.C., Tauxe, R.V., 1990. International in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, 105, 21-27.

Samelis, J., Ikeda J.S., Sofos J.N., 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 95, 563-575.

Santos, S.M., Kupek, E., 2000. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. *Braz. J. Infect. Dis.* 4, 275-278.

Scuderi G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastasio, M.P., 1996. Foodborne outbreak caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. *Epidemiol. Infect.* 116, 257-265.

Silveira, J.B., Tondo, E.C., 2006. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis. Epidemiology and Public Health. Sixth ed. Saint Malo, France, pp. 521-522.

Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C, Peresi, J.T, Fuzihara, T.O., Yonamine, E.K., Jakabi, M., Fernandes, S.A., 2002. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman source in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. J. Food Protec. 65, 1041-1044.

Tetteh G.L., Beach L.R., 2003. Exposure of *Shigella flexneri* to acid stress and heat shock enhances acid tolerance. Food Microbiol. 20, 179-185.

Tosun, H.; Gönül S.A., 2003. Acid adaptation protects *Salmonella typhimurium* from environmental stresses. Turk. J. Biol. 27, 31-36.

Tsen, H.Y, Hu, H.H., Lin, J. S., Huang, C. H., Wang, T.K., 2000. Analysis of *Salmonella* Typhimurium isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. Food Microbiol. 17, 143-152.

Wilde S., Jorgense F., Campbell A., Rowbury R. Humprey T., 2000. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. Food Microbiol. 17, 679-686.

Yuk, H.G., Schneider, K.R., 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerator and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. Food Microbiol. 23, 694-700.

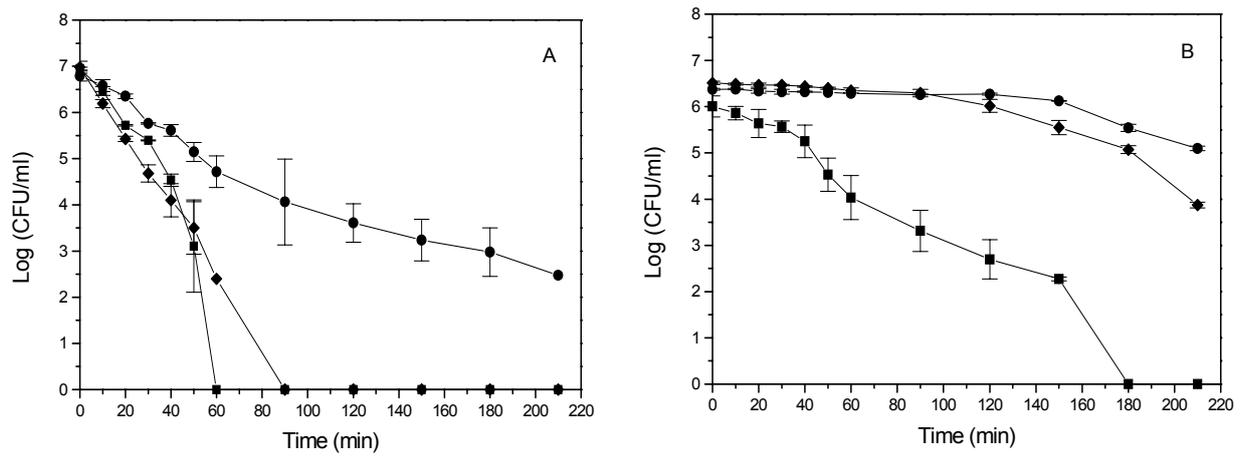


Fig 1. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●) exposed to pH 3.5 in Nutrient Broth. Each data point was represented by mean \pm standard deviation (n = 4).

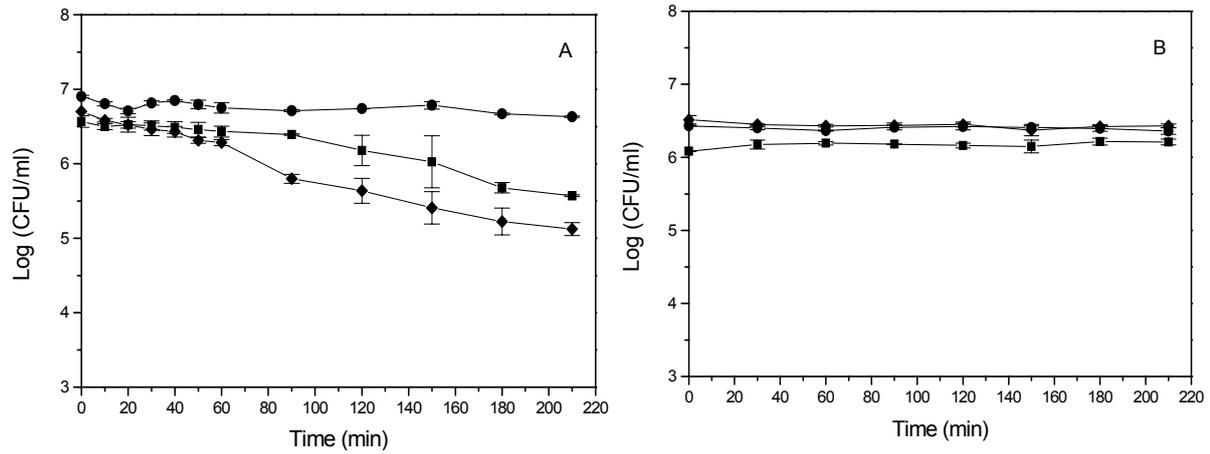


Fig 2. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●) exposed to pH 4.0 in Nutrient Broth. Each data point was represented by mean \pm standard deviation (n = 4).

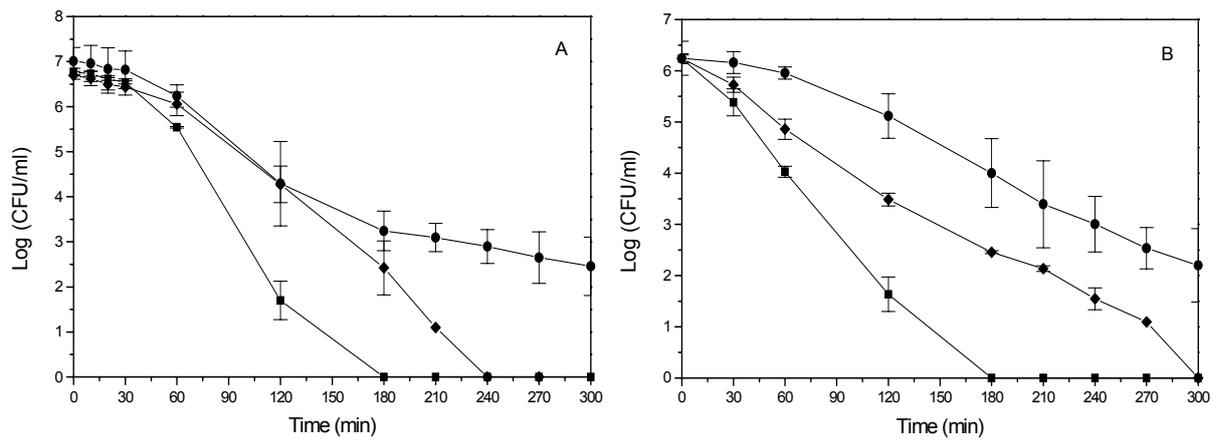


Fig 3. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●) exposed to 52°C in Nutrient Broth. Each data point was represented by mean \pm standard deviation (n = 6).

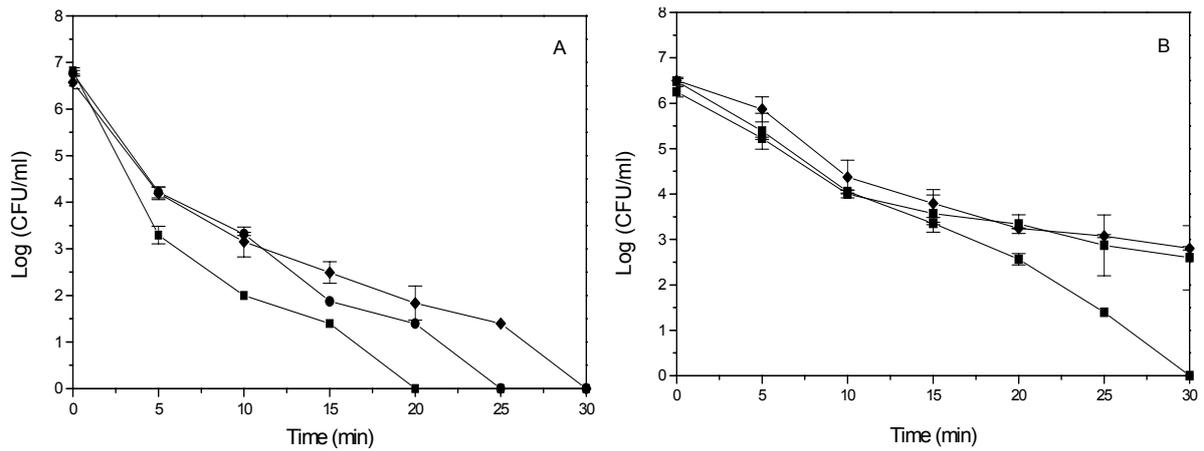


Fig 4. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●) exposed to 56°C in Nutrient Broth. Each data point was represented by mean \pm standard deviation (n = 6).

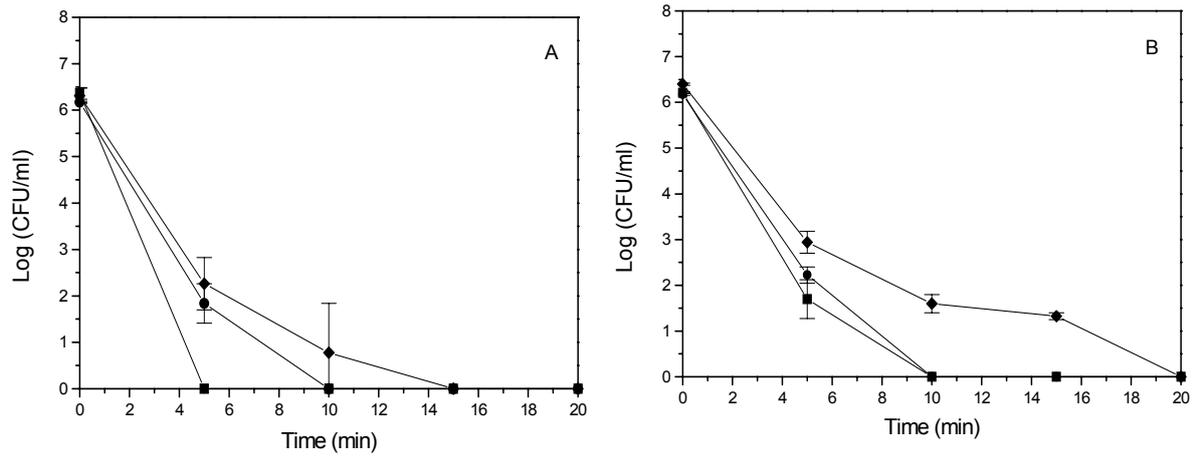


Fig 5. Survival of non-adapted (A) and acid-adapted (B) *Salmonella* Enteritidis (◆), *Salmonella* Typhimurium (■), *Salmonella* Bredeney (●) exposed to 60°C in Nutrient Broth. Each data point was represented by mean \pm standard deviation (n = 6).

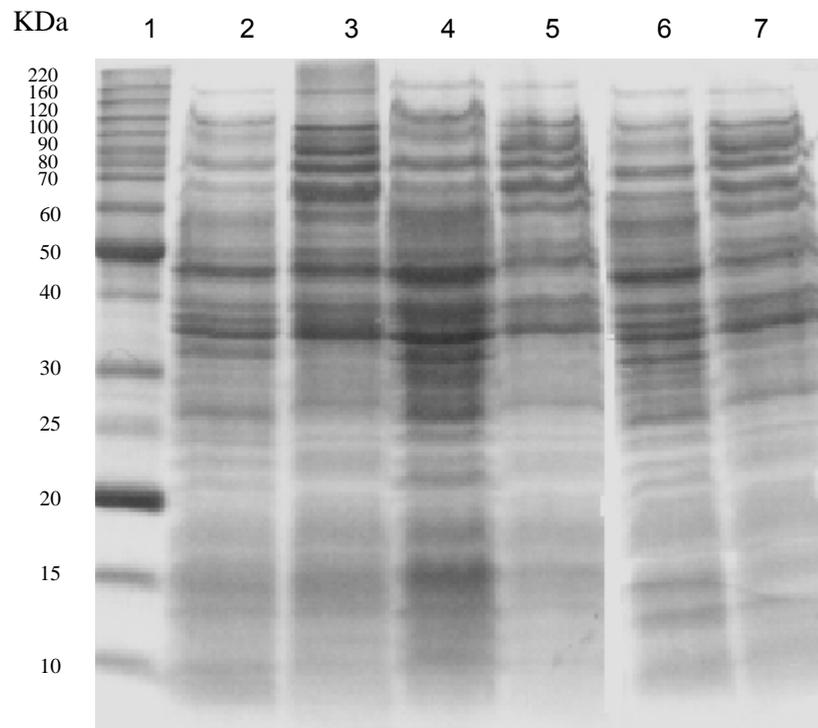


Fig 6. SDS-PAGE profiles of non-adapted and acid-adapted *Salmonella* serovars. Lane 1, marker; lane 2, non-adapted *S. Typhimurium*; lane 3, acid-adapted *S. Typhimurium*; lane 4, non-adapted *S. Enteritidis*; lane 5, acid-adapted *S. Enteritidis*; lane 6 non-adapted *S. Bredeney*; lane 7, acid-adapted *S. Bredeney*.

CAPÍTULO 3

3.1 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos a partir da cinética de crescimento em caldo nutriente (CN) incubado a 30°C (artigo 1) demonstraram grande semelhança para os sorovares *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney*. As três linhagens testadas permaneceram em fase lag por 2 horas e em fase exponencial por 12 horas, aproximadamente. O tempo de geração, ou seja, tempo requerido para a célula bacteriana duplicar seu DNA e dividir-se, foi de 0,69 horas para *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* e 0,71 horas para *S. Enteritidis*.

Os parâmetros de crescimento encontrados nestes experimentos foram comparados com o crescimento de *Salmonella* spp. modelado pelo programa Pathogen Modelling Program (USDA). Segundo a modelagem realizada, a duração média da fase lag foi de 3,1 horas e a população microbiana atingiu a fase estacionária após 15 horas de cultivo. O tempo de geração modelado ficou entre 0,4 e 0,6 horas, ou seja, menores do que os tempos médios de geração das linhagens testadas neste estudo, principalmente em relação à *S. Enteritidis*.

A avaliação da cinética de crescimento também foi realizada a 9,5°C, pois temperaturas próximas a esta podem ser facilmente atingidas em serviços de alimentação. A RDC 216/2004 da ANVISA determina que alimentos refrigerados devam ser conservados em temperaturas inferiores a 5°C, porém estudos demonstraram que essa temperatura nem sempre é atingida em restaurantes comerciais self-service (CORREIA et al., 2002; DAMASCENO et al., 2002).

Nos experimentos conduzidos a 9,5°C, em CN, os sorovares testados permaneceram em fase lag, pelo menos, por 48 horas. Segundo os parâmetros de crescimento modelados pelo Pathogen Modelling Program, a fase lag, a 10°C, teria duração de 37,2 a 90,8 horas (média de 58,1 horas), estando de acordo com os resultados obtidos para os microrganismos testados.

A cinética de crescimento também foi avaliada em salada de batata com maionese caseira (SMC), pois esse foi o alimento mais freqüentemente envolvido nas salmoneloses do RS, no período de 1997 a 2001 (COSTALUNGA; TONDO, 2002; NADVORY et al., 2004; SILVEIRA; TONDO, 2006). Neste alimento, foram inoculados aproximadamente 3 log UFC/mL de cada sorovar, separadamente. Os cultivos foram mantidos a 30°C, simulando condições de temperatura freqüentemente observadas na primavera e verão, pois estas são as estações com

maior incidência de surtos alimentares causados por *Salmonella*, no RS (CONTALUNGA; TONDO, 2002; SILVEIRA; TONDO, 2006). Na SMC, observou-se que os sorovares testados permaneceram aproximadamente 2 horas em fase lag, assim como em CN. Já a fase exponencial apresentou maior duração no alimento, ou seja, 16 horas. Dentre os sorovares testados, a *S. Enteritidis* desenvolveu-se mais rapidamente nas primeiras 6 horas de armazenamento. Em 6 horas, observou-se que a *S. Enteritidis* apresentou uma população de 5,84 log UFC/g, enquanto os sorovares *S. Bredeney* e *S. Typhimurium* apresentaram populações de 4,22 log UFC/g e 2,90 log UFC/g, respectivamente.

Em SMC, a 30°C, o tempo médio de geração para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney* foi de 0,64 horas, 0,68 horas e 0,66 horas, respectivamente. Portanto, pode-se observar semelhança entre os tempos médios de geração em CN e em SMC. O tempo de geração modelado para *Salmonella* foi menor do que aqueles encontrados para as linhagens testadas neste experimento, pois a modelagem demonstrou tempo de geração de 0,3 a 0,5 horas. Entretanto, deve-se levar em consideração que o Pathogen Modelling Program não apresenta parâmetros específicos para simulação de crescimento de *Salmonella* em SMC, sendo que para comparação foram inseridos, neste programa, valores de pH (6,7) e nível inicial de células (aproximadamente 1 log UFC/g) semelhantes aos encontrados na SMC.

Os sorovares também foram inoculados separadamente em SMC, a qual foi mantida a 9,5°C. O alimento foi testado por 24 horas e não foi observado crescimento celular. Portanto, essa temperatura mostrou-se adequada para conter a multiplicação dos sorovares de *Salmonella* testados.

Um dos fatores sugeridos relacionando o envolvimento de maionese caseira com salmoneloses é a utilização de ovos crus (DODSON; EDMONDSON; SHEARD, 1996), possibilitando que um único ovo contaminado provoque a contaminação de todo o produto (SANTOS et al., 2002). Autores ressaltam que o ovo pode estar contaminado por *Salmonella* mesmo sem apresentar características perceptíveis (HUMPHREY, 1994; DE PAULA et al., 2004), portanto, cuidados rigorosos devem ser estabelecidos na produção e armazenamento de ovos, assim como durante sua manipulação. Segundo Humphrey et al. (1989), o maior envolvimento de ovos em surtos alimentares poderia estar relacionado à possibilidade do sorovar *S. Enteritidis* ser transmitido verticalmente por aves infectadas. Foi estimado que 0,5% dos ovos

de aviários contaminados por esse microrganismo podem apresentar *S. Enteritidis* dentro de ovos íntegros, provenientes dos tecidos reprodutivos contaminados (DOYLE; MAZZOTA, 2000). Nos Estados Unidos, estima-se que 0,01% dos ovos comercializados contenham *Salmonella* (MASON, 1994; CHANTARAPANONT et al. 2000). Embora no Brasil haja a investigação por parte de empresas e órgãos fiscalizadores, há grande dificuldade em encontrar estatísticas nacionais que enfatizem a presença de *Salmonella* dentro de ovos.

O freqüente envolvimento da *S. Enteritidis* com ovos ou produtos avícolas (HUMPHREY et al., 1989) e a capacidade de multiplicação mais rápida desse sorovar nas primeiras horas de cultivo, em SMC (artigo 1), podem justificar o maior envolvimento da *S. Enteritidis* nos surtos do RS, envolvendo maionese caseira.

As *Salmonella* estão amplamente distribuídas na natureza, porém o ambiente natural desse microrganismo é o trato intestinal de homens e animais, sendo as aves consideradas seus principais reservatórios (DOYLE; CLIVER, 1990). Para sua sobrevivência na cadeia alimentar, as *Salmonella* precisam responder efetivamente a mudanças ambientais (HUMPHREY, 2004). Embora seja pouco provável a eliminação desse patógeno da cadeia alimentar, pesquisas laboratoriais, tais como a investigação das resistências ácidas e térmicas, podem ser transformadas em estratégias de intervenção para indústria de alimentos e consumidores, objetivando diminuir as salmoneloses.

O segundo artigo da presente dissertação teve como objetivo avaliar a resistência ácida e térmica dos três sorovares de *Salmonella*. Para isso, as linhagens foram cultivadas em diferentes meios de cultura. Os microrganismos foram inoculados, separadamente, em caldo nutriente (CN) e caldo nutriente enriquecido com 1% de glicose (CNG), sendo que este último foi utilizado para produção de culturas ácido-adaptadas.

Para confirmação da indução ácida causada pela diminuição gradual do pH do meio de cultura devido à fermentação da glicose, o pH das culturas foi avaliado. Os resultados demonstraram que a fermentação da glicose pela *Salmonella* diminuiu o pH durante as 18 horas de cultivo a 37°C. O pH do CNG, antes da inoculação, foi de 6.50 ± 0.02 e, após o cultivo com *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney*, o pH diminuiu para 4.47 ± 0.03 , 4.39 ± 0.02 e 4.34 ± 0.05 , respectivamente. Corroborando esses resultados, muitos autores têm demonstrado que a suplementação do meio de cultura com 1% de glicose é um método útil e prático para produção de culturas

ácido-adaptadas (BUCHANAN; EDELSON, 1996; SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003; TETTEH; BEUCHAT, 2003).

O uso de ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, tem sido muito utilizado devido a sua capacidade bactericida e de dano celular (LIAO; FETT, 2005). Esse ácido pode ser naturalmente formado ou adicionado como conservador em alimentos (SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003). No estado do RS, a salada de batata com maionese caseira é tradicionalmente preparada com diferentes doses de vinagre (ácido acético) o que pode resultar em diminuição do pH e conseqüente adaptação ácida das bactérias presentes nesse produto. Em virtude desses fatores, o ácido acético foi escolhido para realização dos experimentos de resistência ácida.

No presente estudo, culturas não adaptadas de *S. Bredeney* mostraram-se mais resistentes do que *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* quando expostas a pH 3,5 e 4,0. Porém, com a adaptação ácida o sorovar *S. Enteritidis* apresentou índice de sobrevivência similar a *S. Bredeney*, demonstrando uma expressiva capacidade de adaptação ácida. Essa capacidade adaptativa também foi observada em *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, porém de maneira menos intensa.

O valor D, ou seja, tempo necessário para inativar 90% da população microbiana (HUMPHREY et al., 1993; JAY, 2005), foi calculado. O valor D (pH 3,5) para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney*, não adaptadas, foi de 15,08 minutos, 13,93 minutos e 49,37 minutos. Após a adaptação ácida, esses valores aumentaram para: 36,57 minutos, 96,36 minutos e 205,34 minutos, respectivamente. Baseado nestes resultados, o valor D (pH 3,5) aumentou quase 2 vezes para *S. Typhimurium*, aproximadamente 4 vezes para *S. Bredeney* e quase 7 vezes para *S. Enteritidis*, confirmando maior capacidade adaptativa apresentada por esse último sorovar.

Quando submetidas a pH 4,0, culturas não adaptadas de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* apresentaram valores D de 215,56 minutos e 125,41 minutos, respectivamente. Culturas não adaptadas ou ácido-adaptadas de *S. Bredeney* e culturas ácido-adaptadas de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* permaneceram sem redução durante o tempo de realização do experimento (210 minutos), não sendo possível, portanto, calcular o valor D desses cultivos. Em pH 4,5 as contagens de células não adaptadas e ácido-adaptadas permaneceram constantes para todos os sorovares testados.

Resultados semelhantes foram reportados por Tetteh e Beuchat (2003), os quais observaram que *Shigella flexneri* ácido adaptadas foram mais resistentes ao ácido acético (pH 3,5 e 4,0) do que culturas não adaptadas.

Todos os sorovares tornaram-se mais resistentes ao ácido após a adaptação, estando de acordo com diversos outros estudos apresentados a seguir. Segundo Leyer e Johnson (1992), a adaptação ácida aumentou a resistência de *Salmonella* spp. para vários tipos de ácidos orgânicos, além de aumentar a sua sobrevivência em alguns alimentos como leite fermentado e queijo. Esses autores demonstraram que *S. Typhimurium* ácido-adaptada em HCl pH 5,8 tornou-se mais resistente ao ácido láctico, ácido propiônico e ácido acético pH 3,85. De maneira semelhante, Tosun and Gönül (2003) demonstraram que *S. Typhimurium* ácido-adaptada em HCl pH 5,8 tornou-se mais resistente ao pH 3,45 (HCl) do que culturas não adaptadas.

Além de *Salmonella* e *Shigella flexneri*, outros microrganismos patogênicos, tais como *Echerichia coli* O157:H7 (LEYER; WANG; JOHNSON, 1995; GAHAN; O'DRISCOLL; HILL, 1996; SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003) e *Listeria monocytogenes* (GAHAN; O'DRISCOLL; HILL, 1996) demonstraram capacidade de adaptação ácida, ressaltando a importância desse estudo para segurança dos alimentos.

Com o propósito de avaliar o perfil protéico das culturas estudadas, o método de SDS-PAGE foi realizado. Observou-se que todos os sorovares de *Salmonella* ácido-adaptados apresentaram uma intensificação nas bandas com peso molecular entre 60 e 120 KDa. O sorovares *S. Enteritidis* e *S. Bredeney* apresentaram uma diminuição na intensidade das bandas entre 25 e 50 KDa. Tetteh e Beuchat (2003) não observaram diferenças no perfil protéico de *Shigella flexneri* controle e submetida ao choque térmico, porém a adaptação ácida induziu a síntese de proteínas.

A cocção permanece como uma das medidas primárias pelas quais microrganismos patogênicos são eliminados de alimentos. O tempo e temperatura de cozimento dependem da resistência térmica dos microrganismos, além da composição e características físico-químicas dos alimentos (BUCHANAN; EDELSON, 1999b). Segundo a Resolução 216/2004 da ANVISA, a cocção deve atingir 70°C em todas as partes dos alimentos, porém é sabido que freqüentemente isso não ocorre, podendo expor os microrganismos a temperaturas sub-letais. Tal exposição, assim como a exposição a quantidades sub-letais de ácidos, podem

induzir a resistência térmica dos microrganismos e permitir a sobrevivência dos mesmos.

Neste estudo, *S. Bredeney* não adaptada e ácido-adaptada apresentou maior resistência térmica a 52°C. Foi observado que a adaptação ácida não influenciou ($P < 0,05$) a resistência térmica, a 52°C, dos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*. Entretanto, *S. Enteritidis* tornou-se mais resistente a essa temperatura após a adaptação ácida. O valor D (52°C) para *S. Enteritidis* não adaptada e ácido-adaptada foi de 38,31 e 51,98 minutos, confirmando a adaptação. De forma semelhante, Wilde et al. (2000) observaram aumento na resistência térmica de *S. Enteritidis* ácido adaptadas. Esses autores encontraram que os valores D (52°C) para linhagens de *S. Enteritidis rpoS* positivas foram de 26 e 21 minutos, sendo que após a adaptação ácida as mesmas linhagens apresentaram valores D (52°C) de 89 e 60 minutos.

Quando submetidas a temperaturas de 56 e 60°C, culturas de *S. Enteritidis* não adaptadas e ácido-adaptadas mostraram-se mais resistentes do que *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*. Todos os sorovares tornaram-se mais resistentes, a 56°C, após a adaptação ácida. Na temperatura de 60°C, a adaptação ácida aumentou a resistência de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, mas *S. Bredeney* manteve o mesmo índice de morte celular.

Buchanan e Edelson (1999b) reportaram que *Escherichia coli* O157:H7, crescendo em meio de cultura contendo glicose, tornou-se mais resistente ao choque térmico (58°C), demonstrando que a adaptação ácida pode aumentar a resistência térmica desse microrganismo.

Humphenson et al. (1998) estudaram a resistência térmica de *S. Enteritidis* em diversas temperaturas. Seus resultados demonstraram que, a 56°C, uma população de 10 log foi inativada entre 30 e 40 minutos, estando de acordo com resultados obtidos no presente trabalho. No entanto, resultados diferentes foram observados, por esses autores, quando as células foram submetidas a 60°C. Segundo eles, uma população de 5 log de *S. Enteritidis* foi inativada em somente 5 minutos. Neste trabalho, uma população inicial de 6-7 log de *S. Enteritidis* não adaptada foi inativada em 15 minutos.

Baseado nos resultados observados neste estudo, a capacidade de multiplicação mais rápida nas primeiras horas de cultivo em salada de batata com maionese caseira, a maior capacidade de adaptação ácida e a maior resistência

térmica demonstradas pela *S. Enteritidis* podem estar relacionadas ao freqüente envolvimento desse sorovar nas salmoneloses do RS.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.
- ALCOCER, I. et al. Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis serovar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 1-16, 2006.
- ANDREWS, W.H. et al. *Salmonella*, p.51-69. In: FOOD and DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 7. ed. Arlington: AOAC International, 1992.
- ANGULO, F.J.; SWERDLOW. Epidemiology of human *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in the United States. In: SAEED, A.M. (ed.). **Salmonella enterica serovar Enteritidis in human and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 33-41.
- ASTEN, A.J.A.M.; KONINKX, J.F.J.G.; DIJK, J.E. *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes (Letters to the Editor). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.108, p.149-152, 2005.
- AUDIA, J.P.; WEBB, C.C.; FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, Germany, v.291, p.97-106, 2001.
- BARROW. P. A. Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. (ed.). **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, , 1999. p.173-181.
- BÄUMLER, A. et al. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, Washington, v.287, p.50-52, 2000.
- BEARSON, S.M.D., et al. Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.178, p.2575-2579, 1996.
- BESSA, C.M.; DA COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004 da. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 set. 2004.
- BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid

tolerance of stationary-phase cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.4009-4013, 1996.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, p.211-218, 1999a.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Effect of pH-dependent, stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, London, v.16, p.447-4458, 1999b.

BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of DNA-based methodologies for subtyping *Salmonella*. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v.28, p.283-323, 1998.

CASTAGNA, F.M.S. **Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal**. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2004.

CHANTARAPANONT, W. et al. Factors influencing inactivation of *Salmonella enteritidis* in hard-cooked eggs. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, p.36-43, 2000.

CORREIA, M.H.S. et al. Avaliação microbiológica de saladas de vegetais com maionese, servidas em restaurantes comerciais self-service por quilo, na região central de Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 63-70, 2002.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.342-346, 2002.

DAMASCENO, K.S.F.S.C et al. Condições higiênico-sanitárias de “Self-Service” do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, p.74-78, 2002.

DARWIN, K.H.; MILLER, V. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.405-428, 1999.

DE PAULA, C. M. D.; MARIOT, R. F.; TONDO, E. C. Thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis by boiling and frying egg methods. **Journal of Food Safety**, Westport, v.25, p.43-57, 2004.

DE PAULA, C.M.D. **Avaliação da sorologia e susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* sp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2003 junho de 2006**. 2006. Monografia (Curso de Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2006.

DEVLIEGHERE, F. et al. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **Food Microbiology**, London, v.18, p.53-66, 2001.

DODSON, H.I.; EDMONDSON, A.S.; SHEARD, M. A. Microbiological safety of recipe mayonnaises. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CULINARY ARTS AND SCIENCE, 1., Southampton , 1996. **Culinary arts and science: global and national perspectives**. Southampton: Computational Mechanics Publication, 1996. p.199-208.

DOYLE, E.M.; MAZZOTTA, A.S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, p.779-795, 2000.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. (ed). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p.185-204,

EDUARDO, M.B.P. et al. *Salmonella* Enteritidis/Salmonelose. In: SÃO PAULO. Secretaria da Saúde. Divisão de Doenças e Transmissão Hídrica e Alimentar. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**. São Paulo., 2003. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/IF_59Sen.htm>. Acesso em: 07 nov 2006.

EKDAHL , K. et al. Travel-associated non-typhoidal salmonellosis: geographical and seasonal differences and serotype distribution. **Clinical Microbiology Infection**, London, v.11, p.138-144, 2004.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOSTER, J. W. Microbial responses to acid stress. In: STORZ, G.; HEGGE-ARONIS, R. (ed.). **Bacterial stress responses**. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p.99-115

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PRODUÇÃO E PESQUISA EM SAÚDE. Instituto de Pesquisa Biológicas. Laboratório Central do Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN). **Relatório de Investigações de surtos de Salmonelose de 1984 a 1999**. Porto Alegre, 1999.

GAHAN, C.G.M.; O'DRISCOLL, B.; HILL, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acids foods and during milk fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.3128-3132, 1996.

GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, p.1229-1233, 2004.

GLÓSNICKA, R.; KUNIKOWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.19-30, 1994.

GORDEN, J.; SMALL, P.L.C. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p.364-367, 1993.

HENGGE-ARONIS, R. Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.21, p.887-893, 1996.

HEYNDRICKX, M. et al. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. **The Veterinary Journal**, London, v.170, p.275-277, 2005.

HUMPHREY, T. J. et al. The survival of salmonella in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.103, p.35-45, 1989.

HUMPHREY, T.J. et al. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* Phage Type 4. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.3129-3122, 1993.

HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: A Review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.31-40, 1994.

HUMPHREY, T.J. et al. *Salmonella enteritidis* Phage Type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3161-3164, 1995.

HUMPHREY, T.J. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Science and Society**, New York, v.2, p.504-509, 2004.

HUMPHESON, L. et al. Biphasic Thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.459-464, 1998.

HURLEY, B.P.; McCORMICK, B.A. Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella typhimurium*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.11, p.562-569, 2003.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.26, p.59-73, 2002.

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

JENKINS, D.E; SCHULTZ, J.E; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.170, p.3910-3914, 1988.

JIMÉNEZ, M.M.S.; CASTRO, N.M.C. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. **Infectio**, Bogotá, v.7, p.22-29, 2003.

- KANELLOS, T.S.; BURRIEL, A.R. The *in vitro* bactericidal effects of the food decontaminants lactic acid and trisodium phosphate. **Food Microbiology**, London, v.22, p.591-594, 2005.
- KAUFFMAN, F. **Serological diagnosis of *Salmonella* species, Kauffmann-White schema**. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1972.
- KHAN, I.A. et al. Application of whole cell protein analysis by SDS-PAGE to establish the source of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Infection**, v. 33, p. 169-171, 1996.
- KONEMAN, E.K. et al. **Diagnostic Microbiology**. 5.ed. New York: Lippincott, 1997.
- LACONHA, I.D.L. et al. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.75, p.155-165, 2000.
- LANDERAS, E. et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.2294-2296, 1996.
- LEE, I.S. et al. The stationary-phase sigma factor σ^S (RpoS) is required for sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.17, p.155-167, 1995.
- LEYER, G.J.; JOHNSON E.A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2075-2080, 1992.
- LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross protection against environment stresses in *Salmonella typhimurium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1842-1847, 1993.
- LEYER, G.H.; WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p. 3752-3755, 1995.
- LIAO, C.; FETT, W.F. Resuscitation of acid-injured *Salmonella* in enrichment broth, in apple juice and on the surfaces of fresh-cut cucumber and apple. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.41, p.487-492, 2005.
- LIN, J. et al. Comparative analysis of extreme acid survival of *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.177, p.4097-4104, 1995.
- LIU, F.; YANG, R.Q.; LI, Y.F. Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and atmosphere at -2.4 and 10°C. **Food Microbiology**, London, v.23, p.578-583, 2006.

LOPALCO, P.L. et al. Epidemiologic study and cost analysis of a *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Annali di Igiene**, Roma, v.12, p.279-285, 2000.

MANO, S.B.; ORDONEZ, J.A.; GARCIA, G.D. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. **Food Microbiology**, London, v.17, p.651-669, 2000.

MASON, J. *Salmonella enteritidis* control programs in the United States. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 155-169, 1994.

NADVORNY, A. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, p.47-51, 2004.

NASTASI, A.; MAMMINA, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype infections in southern Italy during the years 1980-1994. **Research in Microbiology**, Paris, v.147, p.393-403, 1996.

NYLEN, G.; FIELDER, H.M.P.; PALMER, S.R. An international outbreaks of *Salmonella enteritidis* associated with lasagna: lessons on the need for cross-national co-operation in investigating foodborne outbreaks. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.123, p.31-35, 1999.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v.52. p.259-274, 2001.

OLIVEIRA, F.A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.** 73f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2005

PATRICK, M.E. et al. *Salmonella* Enteritidis Infections, United States, 1985-1999. **Emerging Infections Diseases**, Washington, v.10, p.1-7, 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid>>. Acesso em: 20 nov. 2006.

PARRA, F.E. Exclusión competitiva em Salmonelosis: revision. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIÁRIA, 1994, Athens. **Anais...** Athens: University of Georgia, 1994. 703p.

PERALES, I.; GARCIA, M.I. The influence of pH and temperature on the behaviour of *Samonella enteritidis* phage type 4 in home-made mayonnaise. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.10, p.19-22, 1990.

PERNI S.; ANDREW, W.P.; SHAMA G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curve: definition is everything. **Food Microbiology**, London, v.22, p.491-495, 2005.

PIN, F.; BARANYI, J. Predictive models as means to quantify the interaction of spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.41, p.59-72, 1998.

RODRIGUE, D.C. et al. International in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.105, p.21-27, 1990.

RODRIGUES, C.C. et al. SDS-PAGE and numerical analysis of *Candida albicans* from human oral cavity and other anatomical side. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.40-47, 2004.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environment. **Food Microbiology**, London, v.16, p.317-324, 1999.

SAMELIS, J.; IKEDA J.S.; SOFOS, J.N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 95, p. 563-575, 2003.

SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 93-99, 2002.

SANTOS, S.M.; KUPEK, E. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p. 275-278, 2000.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity island in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.17, p.14-56, 2004.

SCUDERI, G. et al. Foodborne outbreak caused by *Salmonella* in Italy, 1991-4. **Epidemiology and Infection**. Cambridge, v.116, p.257-265, 1996.

SHELOBOLINA, E.S. et al. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.2959-2965, 2004.

SILVEIRA, J.B.; TONDO, E.C. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS, 2006, Saint-Malo, France. **Epidemiology and Public Health**. Saint Malo, France: Pierre Colin e Geneviève Clément, 2006. Sessão 5, p. 521-522.

SOLARI, C. A. et al. Caracterização dos sorovares de *Salmonella* isolados de aves de diferentes estados no quinquênio 1992-96. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

MICROBIOLOGIA, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 126.

STANLEY, J. et al. Genetic relationships among strains of *Salmonella enteritidis* in a national epidemic in Switzerland. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.108, p.213-220, 1992.

TAVECHIO, A.T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman source in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, p.1041-1044, 2002.

TETTEH, G.L.; BEAUCH, L.R. Exposure of *Shigella flexneri* to acid stress and heat shock enhances acid tolerance. **Food Microbiology**, London, v.20, p.179-185, 2003.

TOSUN, H.; GÖNÜL S.A. Acid adaptation protects *Salmonella typhimurium* from environmental stresses. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, Turkey, v.27, p.31-36, 2003.

WILDE, S. et al. Growth of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. **Food Microbiology**, London, v.17, p.679-686, 2000.

WILSON, J.W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, London, v.78, p.216-224, 2002.

YUK, H.G; SCHNEIDER, K.R. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerator and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. **Food Microbiology**, London, v.23, p.694-700, 2006.