

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

CAROLINA SOUZA VICTOR DE OLIVEIRA

DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM LEITE ARMAZENADO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES POR PCR

NITERÓI

2012

CAROLINA SOUZA VICTOR DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM LEITE ARMAZENADO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES POR PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

Co-orientador: Prof. Dr. RAFAEL BRANDÃO VARELLA

Co-orientadora: Profa. MSc. ANDRÉA MATTA RISTOW

Niterói
2012

CAROLINA SOUZA VICTOR DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM LEITE ARMAZENADO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES POR PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Aprovada em de de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez – Orientador
UFF

Prof. Dr. Rafael Brandão Varella – Co-orientador
UFF

Profa. Dra. Valéria Moura de Oliveira
UFRRJ

Niterói
2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Newton Victor de Oliveira e Marisa Renata de Souza Oliveira, por sempre estarem presentes em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Sloboda Cortez pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Rafael Brandão Varella por ter aceitado participar do projeto, por sua disponibilidade constante e por suas contribuições ao trabalho. Com certeza, sem a sua orientação o projeto não teria sido desenvolvido. Serei eternamente grata por sua dedicação e por seus ensinamentos, sejam eles da época de faculdade ou durante o mestrado.

À amiga e professora Andréa Matta Ristow que sem dúvida foi a minha maior incentivadora do curso de mestrado. Desde a graduação, sempre esteve presente e, hoje, é um exemplo de profissionalismo e de perseverança. As suas contribuições foram de extrema importância para o meu crescimento profissional. Não tenho palavras para agradecer o seu empenho para sempre estar presente na minha vida pessoal e profissional mesmo que de longe, seja através de uma mensagem no celular, de um email ou de uma ligação com palavras de carinho, incentivo e de conforto.

À Profa. Dra. Alda Letícia dos Santos por ter me apresentado à estatística Dra. Janaína Costa Ribeiro.

À Profa. Dra. Janaína Costa Ribeiro por sua disposição em ajudar na parte estatística do trabalho. Pela paciência, pela disponibilidade e pelos esclarecimentos estatísticos. Sem dúvida, as suas contribuições tiveram papel fundamental no desenvolvimento da estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco pela ajuda dada à parte bacteriológica do trabalho.

À amiga, Daniella Cristina Bernardi, por ter ajudado na preparação dos meios de cultura e dos materiais de laboratório e por sua companhia durante as aulas do curso de mestrado.

Aos colegas do curso de mestrado, em especial à Juliana Niedu e Janaína Ribeiro, por proporcionarem momentos inesquecíveis ao longo deste período.

À amiga, Júlia Piereck Bevilaqua, por colocar a sua casa à disposição e por sempre estar acompanhando de perto o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus primos, Nara Guimarães Victor de Oliveira e Henrique do Couto de Oliveira, por comemorarem junto comigo cada passo profissional e por sempre estarem dispostos a ouvir e a aconselhar.

Ao meu noivo, André Occhioni, pelos momentos de companhia, pelas palavras de incentivo e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense (UFF) pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido durante o curso de mestrado.

RESUMO

Amostras de leite UHT integral armazenadas sob refrigeração e congelamento e inoculadas com cepas de referência da Fundação Oswaldo Cruz foram utilizadas para avaliar a capacidade de detecção da *E. coli* O157:H7 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pela Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e pelo kit comercial RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes. Foram utilizadas as seguintes cepas: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica Typhi* (ATCC 6539) e *E. coli* enterohemorrágica (CDC EDL – 933). As análises foram realizadas nos 4^o e 7^o dias de refrigeração e nos 15^o, 30^o, 60^o e 120^o dias de congelamento. Foi possível realizar a detecção da *E. coli* O157:H7 por meio da PCR em todas as amostras contaminadas artificialmente. Com a CBHAM foi possível realizar a detecção da bactéria nas amostras referentes ao 4^o e 7^o dia de resfriamento e no 15^o dia de congelamento. E com o kit comercial RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes esta detecção foi possível somente nas amostras resfriadas. Os resultados confirmaram a alta sensibilidade da PCR na detecção de *E. coli* O157:H7.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Escherichia coli* O157:H7, leite, PCR.

ABSTRACT

Samples of UHT whole milk stored under refrigeration and freezing and inoculated with reference strains of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) were used to evaluate the detection ability of *E. coli* O157:H7 by Polymerase Chain Reaction (PCR), the count of Aerobic Mesophilic Heterotrophic Bacteria and the commercial kit RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliform. We used the following strains: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica Typhi* (ATCC 6539) e *E. coli* enterohaemorrhagic (CDC EDL – 933). Analyses were performed in the 4th and 7th days of refrigeration and in the 15th, 30th, 60th and 120th days of freezing. It was possible to perform the detection of *E. coli* O157:H7 by PCR for all samples artificially contaminated. However, it was possible to detect the bacteria by CBHAM in the samples after four and seven days of cooling and fifteen days of freezing. And with the commercial kit RIDA[®] COUNT *Escherichia coli* / Coliform this detection was possible only in refrigerated samples. The results confirmed the high sensitivity of PCR for detecting *E. coli* O157:H7.

Key-words: *Escherichia coli* enterohaemorrhagic, *Escherichia coli* O157:H7, milk, PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fotografia do gel de agarose a 1,5% da PCR referentes às amostras armazenadas durante 4 e 7 dias de resfriamento e 15 dias de congelamento, p.39

FIGURA 2: Fotografia do gel de agarose a 1,5% da PCR referentes às amostras armazenadas durante 30 e 60 dias de congelamento e às diluições 10^{-16} , 10^{-17} , 10^{-18} , 10^{-19} e 10^{-20} , p.39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Adições realizadas ao leite integral, p.33

Quadro 2: Resultados do Teste do Qui-quadrado referentes à influência da presença do azidiol na detecção de *E. coli* O157:H7, p.40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	Ágar Padrão para Contagem
Caldo EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
CBHAM	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Mda	Mega-daltons
mL	Mililitro
µl	Microlitro
mPCR	PCR do tipo multiplex
NMP	Número Mais Provável
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Picomol
®	Marca registrada
SLTs	Toxinas shiga-like
STEC	<i>Escherichia coli</i> Shiga Toxigênica
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
SSP	Solução Salina Peptonada
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
VNC	Viável não cultivável
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
VTs	Verotoxinas
VT-I	Verotoxina-I
VT-II	Verotoxina-II
VT-III	Verotoxina-III

SUMÁRIO

RESUMO, p.5

ABSTRACT, p.6

LISTA DE FIGURAS, p.7

LISTA DE QUADROS, p.8

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p.9

1 INTRODUÇÃO, p.12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.13

2.1 *ESCHERICHIA COLI*, p.13

2.1.1 **Características gerais**, p.13

2.1.2 ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**, p.14

2.1.2.1 *E. coli* O157:H7, p.15

2.1.2.2 Mecanismos de patogenicidade da *E. coli* O157:H7, p.17

2.1.2.3 Surtos e infecções provocados por *E. coli* O157:H7, p.19

2.1.3 **Prevalência de *E. coli* O157:H7 em alimentos**, p.20

2.1.4 **Viabilidade da *E. coli* no leite e derivados lácteos**, p.22

2.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *E. COLI* O157:H7 EM ALIMENTOS, p.24

2.2.1 **Metodologia tradicional**, p.24

2.2.2 **Kit comercial RIDA[®] COUNT**, p.25

2.2.3 **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**, p.25

2.3 **USO DO AZIDIOL COMO CONSERVANTE DO LEITE**, p.29

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.30

3.1 BACTERIOLOGIA, p.30

3.1.1 **Preparo do material do laboratório**, p.30

3.2 **AMOSTRAS DE LEITE UHT INTEGRAL**, p.30

3.3 CONTROLE BACTERIOLÓGICO DO FRASCO CONTENDO AZIDIOL
COMPRIMIDO, p.31

3.4 AMOSTRAS BACTERIANAS DE REFERÊNCIA, p.31

3.5 OBTENÇÃO DAS DILUIÇÕES, p.31

3.6 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO LEITE, p.33

3.6.1 **Armazenamento do leite contaminado experimentalmente**, p.34

3.7 CULTIVO BACTERIOLÓGICO, p.35

3.8 *PRIMERS* UTILIZADOS, p.35

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO, p.35

3.10 PCR, p.36

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.36

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.37

4.1 AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA, p.37

4.1.1 **Leite UHT integral**, p.37

4.1.2 **Frasco com comprimido de azidiol**, p.37

4.2 CULTIVO BACTERIOLÓGICO, p.37

4.3 PCR, p.38

5 CONCLUSÃO, p.43

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.44

1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* O157:H7 é uma bactéria patogênica, pertencente ao grupo da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), e é responsável por diversos surtos envolvendo o consumo de produtos de origem animal e de água contaminados. Dentre estes produtos, destacam-se o leite e seus derivados.

É uma bactéria que não apresenta resistência ao processo de pasteurização, porém resiste ao resfriamento e ao congelamento.

A detecção da *E. coli* O157:H7 em alimentos pode ser feita utilizando as técnicas tradicionais de cultivo bacteriológico ou as técnicas moleculares. Com o passar do tempo e com a necessidade da realização da detecção em um curto espaço de tempo utilizando uma técnica menos trabalhosa, as técnicas moleculares ganharam uma grande importância no controle bacteriológico dos alimentos.

Dentre estas técnicas, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é uma técnica promissora para ser utilizada na detecção de microrganismos na indústria alimentícia por conferir o resultado em um pequeno espaço de tempo e por ter a capacidade de detectar as células viáveis e não-viáveis em um alimento.

Um dos entraves para o uso da PCR em amostras de leite é a presença de gordura e de proteinases. A matéria gordurosa pode influenciar na extração do DNA e conseqüentemente na reação da PCR. Já as proteinases são substâncias inibidoras da PCR. Por isso, na maioria das vezes, existe a necessidade de ser feito um pré-enriquecimento da amostra antes da extração do DNA.

Os objetivos do presente experimento foram avaliar a sensibilidade da PCR na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em leite UHT integral com alta e baixa contaminação armazenados durante diferentes tempos de estocagem, em refrigeração e em congelamento e avaliar a influência do conservante azidiol na PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *ESCHERICHIA COLI*

2.1.1 Características gerais

O gênero *Escherichia* é formado por diversas espécies, porém somente a *E. coli* é um patógeno com importância para humanos e para animais. São microrganismos Gram-negativos, bastonetes, não-esporulados, anaeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (HIRSH; ZEE, 2003).

A *E. coli* faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes que são capazes de fermentar a lactose à 44,5-45,5°C em 24 horas com produção de gás. Possui como habitat natural o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo por isso considerada indicadora de contaminação fecal de alimentos (SILVA et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Esta espécie apresenta antígenos somáticos O, termoestáveis, relacionados com polissacarídeos da membrana externa, antígenos flagelares H, termolábeis, relacionados com proteínas de flagelos, e ainda, antígenos K, termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Entretanto, nem todas as amostras apresentam os três tipos ao mesmo tempo. O antígeno O identifica o sorogrupo da cepa e a combinação do antígeno O e H identifica o sorotipo. Foram descritos 173 antígenos O, 56 H e 100 K diferentes (MENG et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Possui a capacidade de exercer um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E. coli*, entretanto, há um grupo capaz

de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E. coli* enteropatogênicas (FDA, 2009).

Segundo Adams; Moss (2008) as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em quatro tipos baseados nas características de virulência: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Mellies; Barron; Carmona (2007) e Meng et al. (2001) categorizam ainda mais dois patotipos: *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* de aderência difusa.

2.1.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A EHEC é também chamada de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou de *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) por ter a capacidade de produzir toxinas que são citotóxicas para as células Vero e por ser semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* (O'BRIEN et al., 1982).

Mais de cem sorogrupos de *E. coli* produzem essas toxinas, porém nem todas as STEC são consideradas patogênicas. Outros fatores de virulência são importantes para que ocorra a infecção e a doença (NATARO; KAPER, 1998).

Nesta classe estão incluídas as cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157:H7. São capazes de provocar colites enterohemorrágicas que evoluem para a Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH). Essas cepas produzem toxinas shiga, se fixam e provocam lesões nas células epiteliais humanas (ibid.).

Os quadros de colites enterohemorrágicas geralmente são auto-limitantes com diarreia aguda e sanguinolenta durante 4 a 10 dias. Os sintomas começam com dores de estômago e diarreia aquosa 1 a 2 dias após a ingestão do alimento contaminado, progredindo para diarreia sanguinolenta com dor abdominal aguda (ADAMS; MOSS, 2008). A febre é baixa ou ausente. Alguns indivíduos exibem apenas diarreia aquosa (FDA, 2009).

Algumas vítimas, particularmente as mais jovens, desenvolvem como complicação a SUH, caracterizada por insuficiência renal aguda e anemia hemolítica. De 0 a 15% das vítimas de colite hemorrágica desenvolvem a SUH. A doença pode levar à perda permanente da função renal. Nos idosos a SUH, somada a febre e sintomas neurológicos, constituem uma doença chamada Púrpura

Trombocitopênica Trombótica (PTT), a qual pode ter uma taxa de mortalidade de até 50% (ibid.).

A EHEC é capaz de infectar uma variedade de pessoas. Entretanto, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos possuem alto risco de ter os sintomas clínicos da doença e complicações severas (RENTNER; SARGEANT, 2002).

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC. Por isso, a carne bovina, é o principal veículo deste patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorridos nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra e Alemanha foram associados ao consumo de carne bovina, em especial ao hambúrguer, razão pela qual a síndrome provocada pela EHEC tem a denominação de “doença do hambúrguer” (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.1.2.1 *E. coli* O157:H7

A *E. coli* O157:H7 surgiu como um patógeno de origem alimentar com grande significância em saúde pública nos Estados Unidos (GRIFFIN; TAUXE, 1991). Foi identificado nos EUA, em 1982, como o agente responsável por surtos de colites enterohemorrágicas associado ao consumo de carnes de hambúrgueres mal passadas e contaminadas (RILEY et al., 1983).

É uma bactéria patogênica, cujas doenças transmitidas por alimentos são classificadas no grupo de risco IA de acordo com a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002). A dose infectiva é ainda desconhecida. Porém, por meio da compilação de dados de surtos investigados, incluindo a habilidade do microrganismo de ser transmitido de pessoa a pessoa, estima-se que a dose infectante encontre-se na faixa de 10 células por grama ou mililitro do alimento consumido (FDA, 2009).

É considerada uma das principais causas de colites enterohemorrágicas e da SUH (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

A temperatura ótima de crescimento de *E. coli* O157:H7 é de 37°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 8 a 10°C e acima de 44 a 45°C. Este sorogrupo sobrevive ao congelamento, havendo apenas uma diminuição na concentração (FAO/WHO, 2003).

As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli*, são o crescimento pobre ou nulo à 44,5°C, temperatura

normalmente empregada para pesquisa desse microrganismo em alimentos, e a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima B-glicuronidase (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Em função destas diferenças não são detectadas nas análises de coliformes fecais pelo método do número mais provável (NMP), nem nas análises diretas de *E. coli* utilizando substratos para a enzima B-glicuronidase (SILVA et al., 2007).

A adaptação das células bacterianas no trato gastrointestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido resistência em *E. coli* patogênicas e não patogênicas. A *E. coli* O157:H7 com sistema de ácido resistência induzido pode permanecer resistente ao ácido nos alimentos por um determinado período. Uma vez ingeridos através do alimento contaminado, os organismos ácido adaptados são capazes de sobreviver à defesa ácido gástrica do hospedeiro humano e colonizar o intestino através de competição com os organismos comensais. A *E. coli* O157:H7 é considerado um dos sorotipos mais ácido resistentes (CHUNG; BANG; DRAKE, 2006), sendo capaz de sobreviver em produtos lácteos fermentados, os quais apresentam pH baixo, tais como o iogurte e leite acidificado (GOVARIS; KOIDIS; PAPTAEODOROU, 2002).

Infecções humanas vêm sendo comumente associadas com o consumo de uma variedade de alimentos contaminados, como carnes mal passadas (RILEY et al., 1983), leite cru (MARTIN et al., 1986; GRIFFIN; TAUXE, 1991; NEILL, 1994; REITSMA; HENNING, 1996), leite pasteurizado (UPTON; COIA, 1994), água não potável (LICENCE et al., 2001) e com visitas à fazendas abertas ao público (BORCZYK et al., 1987; TREVENA et al., 1996). De acordo com a FDA (2009) o alimento mais implicado nos surtos documentados é o hambúrguer cru ou mal passado, entretanto, outros surtos já envolveram brotos de alfafa, sucos de frutas não pasteurizados, salame, alface, carne de caça, e coalhada de queijo.

Investigações epidemiológicas demonstraram que o gado leiteiro é o reservatório primário desta cepa (BORCZYK et al., 1987; LAHTI et al., 2002). A contaminação fecal do leite é uma importante via de transmissão deste patógeno aos humanos (BORCZYK et al., 1987; HANCOCK et al., 2001). A presença de *E. coli* O157:H7 nas fezes do gado representa um sério risco à saúde pública devido à possibilidade da transmissão direta para humanos ou da contaminação fecal de alimentos, da água e dos ambientes (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996; ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997).

Lahti et al. (2002) relataram a ocorrência de 9 infecções humanas causadas pela *E. coli* O157:H7 na Finlândia associadas com 5 fazendas leiteiras finlandesas. A bactéria foi isolada das fezes dos indivíduos que foram hospitalizados e em alguns casos de membros da mesma família. Em todas as fazendas foram detectadas a presença do patógeno nas fezes de algumas vacas leiteiras.

Evidências sorológicas e bacteriológicas da presença de *E. coli* O157:H7 no gado leiteiro e em membros das famílias das fazendas demonstram a correlação das infecções entre o gado e os humanos (WILSON et al., 1996).

Estudos observaram o papel da água potável dos animais na disseminação de cepas de *E. coli* O157:H7 nos rebanhos leiteiros (FAITH et al., 1996; SHERE; BARTLETT; KASPAR, 1998).

É um microrganismo que não possui resistência ao calor (DOYLE; SCHOENI, 1984), sendo destruída pela pasteurização (D'AOUST et al., 1988). Porém a contaminação por esta bactéria pós-pasteurização é uma preocupação devido à dose infectante ser baixa e por ser ácido-tolerante (ARNOLD; KASPAR, 1995). Em contrapartida, é capaz de sobreviver em produtos que são armazenados congelados como o leite cru (ANSAY; KASPAR, 1997) e a carne moída (DOYLE; SCHOENI, 1984). Sobrevive também em frutas e vegetais armazenados sob condições de refrigeração à uma temperatura de 5°C (ABADIAS et al., 2012).

Além da transmissão por meio dos alimentos, a *E. coli* O157:H7 também pode ser transmitida por contato direto com pessoas infectadas, sobretudo quando há condições inadequadas de higiene (LIOR, 1993).

2.1.2.2 Mecanismos de patogenicidade da *E. coli* O157:H7

A patogenicidade de *E. coli* O157:H7 está relacionada a três fatores de virulência: produção de enterotoxinas semelhantes à da *Shigella*, produção de hemolisina e expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996).

As enterotoxinas produzidas são chamadas verotoxinas (VTs), uma vez que a atividade biológica pode ser observada em células de cultura Vero, originárias de rim de macaco ou toxinas shiga-like (SLTs) que são imunologicamente e estruturalmente

semelhantes à "Shiga toxina", produzida pela *Shigella dysenteriae*. São conhecidas as VT-I, VT-II e VT-III. Cada uma é formada por duas subunidades (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A produção de VT-II está associada ao desenvolvimento da SUH. Estas toxinas são citotóxicas para as células do cólon e íleo (ARMSTRONG; HOLLINGSWORTH; GLENN-MORRIS, 1996).

O proposto modo de ação em células de mamíferos envolve a seguinte sequência de eventos. A subunidade B da toxina liga-se a receptores glicolipídicos na célula. Após internalização, a subunidade A é enzimaticamente reduzida para um fragmento A1, o qual liga-se então a ribossomos 60S para inibir a síntese protéica e causar a morte celular (O'BRIEN et al., 1982).

A EHEC tem também um gene cromossomal denominado *eae*, responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Verifica-se a ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades com eliminação de sangue nas fezes (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A detecção do gene *eae* junto com as VTs em amostras de leite pode ser considerada sugestiva de contaminação por cepa de *E. coli* patogênica (KARNS et al., 2007).

A maioria das *E. coli* O157:H7 carregam um plasmídio de 60 Mda (megadaltons). Observações conflitantes tem sido feitas por diversos autores sobre o papel do plasmídio de 60 Mda conferindo propriedades de aderência ao microrganismo. Entretanto, o processo de colonização do trato intestinal não está totalmente elucidado. Estudos têm revelado que existe um padrão de colonização bastante definido, sendo semelhante às características de fixação e destruição que ocorrem nos casos de infecção humana por *E. coli* O157:H7 (DOYLE, 1991).

A *E. coli* O157:H7 coloniza difusamente o ceco, superfícies do cólon e o epitélio das criptas. As microvilosidades são destruídas e as células epiteliais são irregularmente formadas ou destacadas no local de fixação bacteriana. Alguns estudos revelam a penetração de bactérias dentro de células epiteliais. Porém, a intensiva invasão e multiplicação intracelular, como ocorre nos casos de infecção por *Shigella*, não é observada (DOYLE, 1991).

Pacientes com infecção por *E. coli* O157:H7 dificilmente apresentam febre, o que sugere que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema

circulatório. Há uma colonização do trato intestinal, onde são produzidas as toxinas, as quais são subsequentemente ativas no cólon (PADHYE; DOYLE, 1992).

A patogenia da SUH também está associada com estas toxinas que provocam danos às células endoteliais. Deste modo iniciam um mecanismo de coagulação resultando na formação de microtrombos, os quais poderão obstruir completa ou parcialmente alguns capilares dos rins e de outros órgãos, acarretando em um acúmulo de resíduos no sangue. Estes coágulos podem também obstruir pequenos capilares no cérebro, podendo levar à óbito o paciente (BYRNES; MOAKE, 1986).

2.1.2.3 Surtos e infecções provocados por *E. coli* O157:H7

O leite cru foi reconhecido como um veículo de transmissão da *E. coli* O157:H7, em 1986, quando crianças de famílias do Estado de Wisconsin nos EUA apresentaram quadros de colites enterohemorrágicas e de SUH depois de consumirem leite cru de fazendas leiteiras (MARTIN et al., 1986).

Outro surto relacionado ao consumo de leite cru contaminado por *E. coli* O157:H7 foi relatado em 1993 no Estado de Oregon – EUA. Quatorze indivíduos adoeceram em menos de 1 mês após consumirem leite cru de uma determinada fazenda (KEENE et al., 1997).

Em maio de 1993, ocorreram seis casos de infecção humana por *E. coli* O157:H7 na cidade de Sheffield, Inglaterra e o leite não-pasteurizado foi identificado como a origem da infecção (MECHIE; CHAPMAN; SIDDONS, 1997). Ainda na Inglaterra, o consumo de iogurte de uma marca em particular foi a causa de um surto de *E. coli* O157:H7 em 16 pessoas, tendo como provável causa, uma contaminação pós-pasteurização do leite, uma vez que não foi isolado o agente no leite cru e a pasteurização elimina completamente o agente (MORGAN et al., 1993).

Liptakova et al. (2004) relataram a ocorrência de um surto de SUH provocado pela ingestão de requeijão fabricado a partir de leite cru contaminado por VTEC na Eslováquia em indivíduos de uma mesma família.

Surto de DTA pelo consumo de requeijão produzido a partir de leite cru contaminado com *E. coli* O157:H7 também foi relatado no Estado de Wisconsin, EUA, em junho de 1998. Neste caso, 55 pessoas foram identificadas, laboratorialmente, como portadoras da *E. coli* O157:H7, sendo 25 hospitalizadas. Os

sintomas incluíram diarreia sanguinolenta, cãibra, fadiga e náusea. Além disso, a duração média da diarreia foi de cinco dias (CDC, 2000).

Entre outubro de 2002 e fevereiro de 2003 foram relatados surtos provocados pela ingestão de queijo Gouda produzido com leite cru no Canadá. Os indivíduos que adoeceram desenvolveram a SUH (HONISH et al., 2003).

Na Califórnia, em 2006, seis casos de contaminação por *E. coli* O157:H7 foram identificados, cinco relacionados à ingestão de leite cru e um de colostro cru sabor chocolate, ambos da mesma marca. A idade dos pacientes envolvidos variou entre 6 e 18 anos. E dois pacientes foram hospitalizados com sintomas de SUH. A venda de leite e derivados crus é permitida na Califórnia (CDC, 2008).

Em 2006, nos Estados de Utah e do Novo México nos EUA, houve um surto provocado pela ingestão de espinafre contaminado por *E. coli* O157:H7. Duzentos e cinco pessoas adoeceram e 29% desenvolveram a SUH (GRANT et al., 2008).

Em 2010, 38 pessoas foram infectadas com a cepa de *E. coli* O157:H7 em cinco estados dos EUA a partir do consumo de Queijo Gouda (CDC, 2010).

2.1.3 Prevalência de *E. coli* O157:H7 em alimentos

Arimi et al. (2005) examinaram os riscos de infecções por *E. coli* O157:H7 para os consumidores de diferentes mercados informais de leite cru no Kenya. Das 264 amostras de leite obtidas dos lares dos consumidores foi isolada *E. coli* de 91 amostras, sendo 2 (0,8%) amostras confirmadas com *E. coli* O157:H7. Os autores concluíram que a prevalência de 0,8% do patógeno em questão demonstra um risco potencial de exposição ao patógeno de cerca de três vezes por ano para o consumo diário de leite sem tratamento térmico.

Foram analisadas quanto à presença de *E. coli* O157:H7, 1104 amostras relacionadas com a produção de derivados lácteos, incluindo amostras de queijos úmidos e semi-úmidos vendidas à varejo no comércio dos EUA, amostras de sapatos, roupas e mãos de trabalhadores de indústrias lácteas, amostras de equipamentos utilizados para o processamento do leite e amostras de leite cru e pasteurizado. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença do patógeno (ANSAY; KASPAR, 1997). Resultado semelhante também foi descrito por Massa et al. (1999) que não detectaram a bactéria e nem as VTs em nenhuma das 100

amostras de leite cru oriundas de tanques de refrigeração de fazendas localizadas nas áreas de Puglia e Basilicata na Itália.

O fato de não haver a detecção do microrganismo e de suas toxinas nos alimentos reforçam as observações de que não são muito comuns ou de que existe uma grande dificuldade de fazer o isolamento caso estejam presentes (MASSA et al., 1999).

Em contrapartida, Adesiyun et al. (1997) isolaram 17 (18,5%) de 94 cepas de *E. coli* em amostras de leite cru provenientes de fazendas de Trinidad.

Amostras de leite de tanques de 21 Estados dos EUA foram analisadas quanto à presença de EHEC. Das 859 amostras avaliadas, 2 amostras foram positivas quando submetidas à PCR do tipo multiplex (mPCR) (KARS et al., 2007).

Abdul-Raouf, Ammar e Beuchat (1996) pesquisaram a *E. coli* O157:H7 em 50 amostras de carne moída crua, 50 de galinhas desossadas, 25 de carne de cordeiro e 50 de leite de vaca não-pasteurizado comercializados no Egito. A *E. coli* O157:H7 foi isolada em 6% (3) das amostras de carne moída crua, em 4% (2) das amostras de galinhas desossadas, em 4% (1) das carnes de cordeiros e em 6% (50) das amostras de leite não-pasteurizado.

No estudo realizado por Conedera et al. (2004) foi realizada a pesquisa de verotoxinas produzidas pela *E. coli* O157 (VTEC O157) em carne picada e derivados lácteos na Itália. O resultado mostrou uma baixa prevalência de contaminação pela VTEC O157, onde apenas 0,43% das amostras de carnes picadas cruas estavam contaminadas. Nenhuma amostra de derivados lácteos apresentou a contaminação pela VTEC O157.

Um total de 896 amostras de carnes frescas bovinas, suínas e de frangos vendidos à varejo no comércio de Madison no Canadá foram analisadas quanto à presença de *E. coli* O157:H7. Em 3,7% (6) das amostras de carne bovina, 1,5% (4) das carnes de porcos e 2,0% (4) das carnes de cordeiro foi confirmada a presença do microrganismo (DOYLE; SCHOENI, 1987).

Parma et al. (2000) relataram a prevalência de VTEC em 28% das amostras de hambúrgueres e de carne moídas de um total de 50 amostras analisadas por meio da PCR.

2.1.4 Viabilidade da *E. coli* no leite e derivados lácteos

As bactérias são expostas com frequência a estresses gerados por mudanças na disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, salinidade e iluminação solar, dentre outros fatores. Sendo assim, a persistência do microrganismo no ambiente é determinada pela capacidade de suportar e se adaptar às novas condições. Dependendo do tipo de estresse e da intensidade sofrida, os microrganismos apresentam diferentes respostas adaptativas. Alguns produzem esporos e outros podem entrar em um estado fisiológico chamado de viável não-cultivável (VNC) (FLORESTA, 2006).

O estado VNC é definido como o estado fisiológico onde os microrganismos não são capazes de crescer em meios utilizados pelos métodos tradicionais disponíveis. Porém apresentam características de células vivas, como atividade respiratória, manutenção do potencial de membrana e atividade enzimática. (ROSZAK; COLWELL, 1987).

Este estado é utilizado como uma estratégia de sobrevivência por diversas bactérias como a *Campylobacter* (ROLLINS; COLWELL, 1986), o *Vibrio vulnificus* (OLIVER; NILSSON; KJELLEBERG, 1991), a *Listeria monocytogenes* (BESNARD; FEDERIGHI; CAPPELIER, 2000) e a *E. coli* O157:H7 (MAKINO et al., 2000).

Bactérias que estejam no estado VNC podem recuperar a culturabilidade sem que seja verificado o aumento do número total de células. Este fenômeno é chamado de ressuscitação. Dependendo do caso, somente a retirada do agente causador do estresse é capaz de retornar as células novamente cultiváveis o que pode ser observado na *E. coli* O157:H7 (NAKAGAWA et al., 2000).

Dados sobre a viabilidade da *E. coli* em leite e derivados ainda são escassos. Sendo assim, Pigatto et al. (2009) avaliaram a viabilidade de diferentes cepas de STEC não-O157 em queijo minas frescal produzido com leite artificialmente contaminado. Os produtos finais foram armazenados em refrigeração à 4°C durante 10 dias. Os pesquisadores detectaram cepas viáveis do patógeno em todos os dias de armazenamento dos queijos.

Ansay e Kaspar (1997) inocularam cepas de *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru nas concentrações de 10^1 , 10^2 e 10^3 UFC/mL⁻¹. Uma parte das amostras inoculadas foram armazenadas à 4°C e a outra parte à -20°C. As amostras refrigeradas e congeladas foram testadas quanto à presença da bactéria,

semanalmente, durante 5 e 10 semanas, respectivamente. O microrganismo foi detectado no leite refrigerado em todas as concentrações depois de 21 dias de refrigeração. Após 28 dias de refrigeração, somente no leite inoculado com 10^1 UFC/mL⁻¹ foi possível fazer a detecção através da metodologia tradicional. Para o leite congelado, a pesquisa da bactéria foi positiva em todas as diluições até 63 dias de armazenamento à -20°C.

Em um estudo realizado por Wang, Zhao e Doyle (1997) sobre a sobrevivência da *E. coli* O157:H7 inoculada em leite não-pasteurizado e pasteurizado obteve-se como resultados a sobrevivência do patógeno à 5°C por 28 dias e o aumento da população à 8 e 15°C.

Amostras de leite cru oriundas das regiões de Puglia e da Basilicata foram contaminadas artificialmente com 7 cepas de EHEC e armazenadas à 8°C. Não houve mudanças na população viável de 3 cepas de EHEC até 14 dias. Houve o crescimento da população viável das outras 4 cepas no período entre 9 e 17 dias. Estes resultados indicam uma boa sobrevivência e até mesmo a multiplicação de *E. coli* O157:H7 em leite cru quando estocado à 8°C, além do patógeno não ser inativado pelo sistema lactoperoxidase (MASSA et al., 1999).

De acordo com os resultados de um experimento que avaliou a sobrevivência da *E. coli* O157:H7 em soro de queijo Cheddar pasteurizado e não pasteurizado, a *E. coli* O157:H7 persiste em soro não pasteurizado de queijo Cheddar durante 2 a 3 semanas de estocagem e pode persistir por mais tempo em soro pasteurizado. A adoção de medidas sanitárias durante a estocagem e o tratamento do soro e o uso de leite pasteurizado na produção de queijos minimizam os riscos da *E. coli* O157:H7 no soro (MAREK et al., 2004).

Um estudo avaliou o potencial de crescimento e a sobrevivência da *E. coli* O157:H7 durante a produção e a estocagem em baixas temperaturas do queijo Muçarela utilizando a microbiologia tradicional e o teste de ELISA. Os resultados revelaram que o aquecimento à 80°C durante 5 minutos do requeijão é efetivo no controle da *E. coli* O157:H7 durante a produção do queijo Muçarela. Além disso, a salga e a estocagem à 4°C por 12 horas foram menos efetivos neste controle do que o aquecimento à 80°C. Os autores concluíram que o queijo Muçarela pode ser livre da bactéria somente se as temperaturas usadas durante o processamento do leite forem superiores ou iguais à 80°C (SPANNO et al., 2003).

No doce de leite pastoso, a *E. coli* O157:H7 permaneceu viável por pelo menos 720 horas demonstrando a possibilidade deste alimento ser um veiculador desta bactéria (HENTGES et al., 2008).

Em uma contaminação pós-fermentação de iogurtes desnatado e integral, Bastos (2009) observou que, embora as contagens do patógeno tenham caído continuamente, a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 foi detectada até o quarto dia de estocagem a 4°C, o que a autora considerou ser um problema em pequenos laticínios, pois iogurtes produzidos recentemente são mais rapidamente disponíveis no mercado da região.

A mesma autora, ao fabricar iogurtes com diferentes teores de açúcar e contaminá-los após fermentação, verificou diferença aparente na proteção à *E. coli* O157:H7. Enquanto em iogurte sem adição de sacarose detectou-se a presença do patógeno até o quinto dia de estocagem sob refrigeração, em iogurte produzido com 10 e 15% de sacarose a presença foi detectada até o sétimo e oitavo dias, respectivamente.

2.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *E. COLI* O157:H7 EM ALIMENTOS

2.2.1 Metodologia tradicional

A metodologia tradicional e padronizada de alimentos para pesquisar a presença de bactérias depende do enriquecimento e isolamento presuntivo de colônias em meios sólidos, utilizando meios de diagnóstico aprovados oficialmente. E, geralmente, é seguido por testes bioquímicos e/ou sorológicos para fazer a identificação do microrganismo (MALORNY et al., 2003).

Estes métodos tradicionais de detecção, embora sejam eficientes, requerem vários dias ou semanas para disponibilizar os resultados definitivos. Além disso, as propriedades fenotípicas pela qual as bactérias são identificadas nem sempre podem ser expressas. E quando expressas podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas (THOLOZAN et al., 1999).

A detecção de *E. coli* O157:H7 é baseada nas diferenças fenotípicas existentes entre os outros sorotipos como a sua incapacidade de fermentar o sorbitol em Ágar McConkey e a ausência da atividade das β -glucuronidases (ADAMS; MOSS, 2008).

Quando o Ágar McConkey é utilizado para a pesquisa de *E.coli* O157:H7 e a bactéria está presente colônias incolores serão observadas. Outras bactérias da família Enterobacteriaceae irão formar colônias róseas (MARCH; RATMAN, 1986).

Caldos de enriquecimento contendo peptona, vancomicina e telurito de potássio também são utilizados para aumentar a probabilidade de detecção do microrganismo por fornecerem nutrientes específicos que permitem a produção de mais colônias pelas bactérias específicas (DEISINGH; THOMPSON, 2004).

2.2.2 Kit comercial RIDA[®] COUNT

O kit comercial RIDA[®] COUNT é constituído por placas de cultura prontas para serem usadas impregnadas de meio de cultura desidratado. Podem ser utilizadas para a realização de controlos microbiológicos de rotina em amostras ambientais e alimentares.

É uma alternativa para substituir a metodologia tradicional, sendo de fácil manuseio, mais rápido e menos trabalhoso (MULEC; KRISTUFEK; CHRONAKOVÁ, 2012). Tem sido utilizado com sucesso em indústrias de derivados lácteos para localizar os pontos críticos que necessitam de procedimentos especiais ou de melhorias nos procedimentos de limpeza (SALO et al., 2006).

2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos moleculares compreendem um conjunto de técnicas e reagentes capazes de interagir quimicamente com as moléculas de DNA ou de RNA do genoma microbiano. Esta característica pode tornar os testes moleculares mais rápidos, sensíveis e específicos que os ensaios microbiológicos ou imunológicos na detecção de diversos patógenos (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

Técnicas baseadas em DNA vêm sendo desenvolvidas para a detecção e identificação de microrganismos patogênicos em alimentos (GARCIA et al., 2008; SOEJIMA et al., 2008). A PCR melhorou significativamente a detecção e a identificação de bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Listeria monocytogenes* (NOGVA et al., 2000) e a *E. coli* O157:H7 (DEISINGH; THOMPSON, 2004).

A técnica da PCR baseia-se na polimerização de DNA em cadeia realizada *in vitro*. É um método de amplificação, onde são criadas múltiplas cópias de DNA, por

replicação enzimática, sem necessitar de um organismo vivo (VERSALOVICK et al., 1994).

A PCR utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores que hibridam com cadeias opostas e iniciam a sequência de DNA a amplificar. O processo compreende uma série de ciclos que envolvem desnaturação do DNA molde, ligação dos iniciadores e extensão da cadeia pela DNA polimerase resultando na acumulação de um fragmento de DNA específico cujos terminais são definidos pelo terminal 5' dos iniciadores. Devido à extensão dos iniciadores (*primers*), os produtos sintetizados num dado ciclo serão os moldes do ciclo seguinte. Sendo assim, o número de cópias do DNA alvo quase duplica em cada ciclo (CHAPAVAL et al., 2006).

É uma técnica altamente sensível por meio da qual quantidades pequenas de sequências específicas de DNA ou RNA podem ser amplificadas enzimaticamente. Permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA pela ação da enzima Taq DNA polimerase e de *primers* sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento chamado termociclador que possibilita mudanças de temperaturas por determinados períodos de tempo permitindo a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (KONEMAN et al., 2001).

A principal desvantagem da PCR é que esta técnica não é capaz de discriminar as células viáveis das células mortas (MALORNY et al., 2003; SOEJIMA et al., 2008) impedindo a análise do potencial de risco à saúde por parte dos microrganismos (CAWTHORN; WITTHUHN, 2008). O DNA pode permanecer íntegro por até 3 semanas. Sendo assim, os diagnósticos que se baseiam na quantificação molecular do material genético possuem a tendência de estimar valores superiores de células vivas do que existe na amostra (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008).

A falta de aprovação, padronização e regulamentação pelos órgãos oficiais e a necessidade de um investimento alto em reagentes e equipamentos também são entraves na sua implantação na rotina laboratorial (MALORNY et al., 2003).

A detecção direta de bactérias patogênicas em amostras de alimentos por meio da PCR é uma tarefa prejudicada pela presença de substâncias inibidoras da PCR frequentemente associadas à matriz do alimento e à presença de elevado número de bactérias indígenas (ROSSEN et al., 1992; WILSON, 1997).

A PCR tem sido amplamente aceita como método de escolha para uma rápida e confiável detecção de microrganismos nos alimentos. Esta técnica pode ser muito útil para culturas microbianas puras. Entretanto, quando aplicado diretamente

à amostras de alimentos, a sua eficiência pode ser reduzida. O ponto crucial deste problema está no método de preparação da amostra que pode introduzir substâncias inibidoras impossibilitando a PCR (LAMPEL; ORLANDI; KORNEGAY, 2000).

Além disso, a maioria dos protocolos utilizados necessitam de uma etapa de enriquecimento seletivo para recuperar o potencial de multiplicação da bactéria em amostras de alimentos. Esta etapa, que é realizada antes da extração do DNA da bactéria, possui uma duração que varia de 48 a 72 horas (ASLAM; HOGAN; SMITH, 2003).

É uma técnica que tem sido aplicada na indústria de laticínios, principalmente para fazer a detecção de contaminações microbiológicas. Existe a possibilidade de extrair o DNA do leite e de produtos lácteos processados e utilizá-lo como substrato para a amplificação por PCR do DNA da caseína (VELOSO et al., 2002). Porém, a gordura do leite e outras substâncias presentes no leite podem dificultar a obtenção de um homogeneizado consistente e a extração adequada do DNA das células-alvo bacterianas (RAMESH et al., 2002). As proteinases presentes no leite também são inibidores potenciais da PCR (POWELL et al., 1994).

A PCR vem se tornando uma técnica muito importante para a detecção de *E. coli* O157:H7. A principal razão para este fato é que esta técnica tem a capacidade de amplificar o DNA de uma célula bacteriana única em um tempo próximo de 1 hora, sendo muito mais rápida do que as técnicas tradicionais (DEISINGH; THOMPSON, 2004). Além disso, é uma técnica que apresenta alta sensibilidade para detectar a *E. coli* O157:H7 (YAMAGUCHI et al., 2003). A PCR é aplicável para a detecção de STEC, incluindo a *E. coli* O157:H7, em amostras ambientais e de leite (FODE-VAUGHAN et al., 2003).

Com o passar do tempo, vem surgindo técnicas resultantes de modificações da PCR como a PCR Mutiplex, o RT-PCR, nested PCR e a PCR em tempo real (MOLINA; TOBO, 2004).

Dentre as inúmeras técnicas de PCR disponíveis, a PCR em tempo real é provavelmente a técnica mais promissora. É uma técnica quantitativa que monitora a reação de amplificação em tempo real (HOLLAND; ABRAMSON; GELFAND, 1991).

Li; Zhuang; Mustapha (2005) estudaram a aplicabilidade da mPCR na detecção simultânea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* e *Shigella* presentes em produtos cárneos crus e prontos para o consumo. Concluíram que a técnica é uma

ferramenta microbiológica eficiente para a detecção presuntiva destes 3 microrganismos em carne.

Um ensaio de mPCR para a detecção simultânea de cepas de *E. coli* pertencentes aos três principais grupos de virulência (VTEC, EPEC, ETEC) em leite e derivados foi descrito por Bottero et al. (2004). Essa técnica proposta pode ser convenientemente aplicada para o controle de leite e derivados uma vez que estes alimentos estão frequentemente associados com doenças transmitidas por alimentos pela contaminação por *E. coli*. É capaz de oferecer como resultado informações completas sobre o potencial de distribuição de grupos patogênicos em alimentos (BOTTERO et al., 2004).

Vidal et al. (2004) desenvolveram uma técnica de mPCR para a identificação de EHEC, EPEC e ETEC em amostras de fezes de pacientes com colite hemorrágica, diarreia aquosa ou SUH provocados por surtos alimentares. Segundo os pesquisadores, a mPCR apresentou sensibilidade e especificidade para estas cepas de *E.coli*.

Um protocolo de mPCR para a detecção de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes bovinas contaminadas artificialmente foi desenvolvido por Hu; Zhang; Meitzler (1999). Não foi observada reação cruzada com a microbiota natural presente nas fezes. Além disso, a mPCR apresentou a mesma eficiência do que o método tradicional do cultivo.

Amostras de leite de tanques de laticínios dos EUA foram analisadas quanto a presença de genes associados aos fatores de virulência da EHEC utilizando as técnicas de PCR em tempo real e da mPCR. As amostras foram enriquecidas em caldo *Escherichia coli* (caldo EC). Das 859 amostras analisadas, o gene *eae* foi detectado em 4,2% das amostras. De 4,2% das amostras, pela técnica da PCR em tempo real, somente 0,6% estavam contaminadas. Ao analisarem 0,6% das amostras com a mPCR somente 0,02% das amostras apresentaram-se positivas para EHEC (KARNS et al., 2007).

Cebula; Payne e Feng (1995) desenvolveram um protocolo da mPCR para identificar, simultaneamente, de amostras de alimentos a *E. coli* O157:H7 e o tipo de VT envolvida. De acordo com os pesquisadores, a maior vantagem deste protocolo consiste na possibilidade de identificar o tipo de VT e ao mesmo tempo discriminar outras cepas de *E. coli* produtoras de VT da *E. coli* O157:H7.

2.3 USO DO AZIDIOL COMO CONSERVANTE DO LEITE

O azidiol é uma substância composta por azida sódica, etanol, cloranfenicol, azul de bromofenol e citrato de sódio (LEITE, 2006). É um conservante bacteriostático utilizado em amostras de leite destinadas à contagem bacteriana total por citometria de fluxo (GARNICA; SANTOS; GONZALO, 2011), prolongando a vida útil da amostra (CASTRO et al., 2006) por reduzir a atividade metabólica das bactérias (JATOBÁ, 2009).

A sua ação bacteriostática é conferida pela ação da azida sódica (GONZALO et al., 2003).

É recomendado que a amostra com azidiol seja analisada em até 4 dias após a coleta quando armazenada sob refrigeração à 4°C (GONZALO et al., 2003).

No Brasil, o azidiol é comercializado nas formas líquidas ou em comprimido (JATOBÁ, 2009). Para que a amostra seja conservada corretamente é necessário adicionar à amostra quantidades adequadas de azidiol, o que é dificultado pelo conservante na forma líquida (CASTRO et al., 2006).

Além disso, por ser um conservante que possui propriedades cancerígenas (JATOBÁ, 2009) e pelo risco de contaminação da amostra de leite pela manipulação excessiva no momento da coleta, foi desenvolvida a forma em comprimido (CASTRO et al., 2006) que oferece maior segurança no manuseio da amostra (JATOBÁ, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTERIOLOGIA

As análises bacteriológicas e a contaminação experimental das amostras de leite UHT integral foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF).

3.1.1 Preparo do material do laboratório

O preparo do material laboratorial utilizado neste experimento envolveu todos os procedimentos necessários para garantir que as vidrarias e os recipientes se encontrassem limpos e estéreis no momento das análises.

Os meios de cultura utilizados no presente estudo foram preparados de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes.

3.2 AMOSTRAS DE LEITE UHT INTEGRAL

As amostras de leite UHT integral utilizadas neste experimento foram adquiridas em um supermercado do bairro da Barra da Tijuca no dia 03 de julho de 2011. Todas as amostras eram do mesmo fabricante e do mesmo lote.

Como controle de qualidade da matéria-prima foram realizadas a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (BRASIL, 2003) e a determinação do teor de acidez titulável (BRASIL, 2006).

As análises físico-químicas foram realizadas no laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados pertencente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF.

3.3 CONTROLE BACTERIOLÓGICO DO FRASCO CONTENDO AZIDIOL COMPRIMIDO

Para verificar a esterilidade do frasco coletor de 50 mL, estéril com azidiol comprimido (Top Line Embalagens Plásticas Ltda) foi feita a CBHAM adicionando-se 50 mL de leite integral estéril, sabidamente negativo no diagnóstico microbiológico, ao frasco contendo o conservante. Foi realizada a homogeneização até o momento em que o azidiol apresentou-se totalmente dissolvido.

Inoculou-se 1 mL do leite com azidiol em placas de Petri vazias, estéreis e em triplicata. Logo em seguida, foi adicionado o Ágar Padrão para Contagem (APC) e foi realizada a homogeneização. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas à 35° C por 48 horas.

3.4 AMOSTRAS BACTERIANAS DE REFERÊNCIA

Foram utilizadas cepas de referência liofilizadas obtidas da coleção de microrganismos de referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sendo elas: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi* (ATCC 6539) e *E. coli* enterohemorrágica (CDC EDL – 933) para a realização da contaminação experimental do leite. Todas as cepas foram mantidas à -18° C até o momento do uso.

3.5 OBTENÇÃO DAS DILUIÇÕES

As cepas bacterianas liofilizadas foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,5 mL do Caldo Triptona de Soja (TSB) - Himedia de acordo com as instruções para reidratação das culturas fornecidas pela FIOCRUZ. Após a ressuspensão, as

cepas bacterianas foram inoculadas no mesmo caldo e incubadas à 35° C durante 24 horas.

Depois desta incubação, foi observada a turvação do meio caracterizando o crescimento do microrganismo no caldo TSB.

Foi semeado o caldo TSB em ágar nutriente inclinado por 24 horas à 35° C.

A concentração desejada de EHEC, para a inoculação no leite, de 10^5 , foi obtida utilizando-se a escala de Mac Farland. Colônias de EHEC que cresceram no Ágar nutriente foram transferidas para um tubo de ensaio contendo Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% até a obtenção da turvação compatível com a escala 5 de Mac Farland.

A partir da obtenção da turvação correspondente à $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, foram realizadas diluições decimais da cultura de EHEC diluindo-se 0,6 mL da cultura em 5,4 mL de SSP a 0,1% (GARCIA et al., 2008) até atingir a diluição 10^{-32} .

De cada diluição, 1 mL foi inoculado em placas de Petri vazias, estéreis e em triplicata adicionando-se 12 mL de APC (Himedia) para a realização da contagem bacteriana total de cada diluição. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas à 35° C por 48 horas.

Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram colocadas em eppendorfs previamente identificados e armazenados à -20° C para posterior realização da mPCR.

Para a obtenção da concentração desejada, de 10^5 , do conjunto de bactérias composto por *L. monocytogenes*, *S. aureus* e de *S. typhi* foram transferidas as colônias de cada bactéria que cresceram em Ágar nutriente para um tubo de ensaio com SSP a 0,1% até a obtenção da turvação compatível com a escala 5 de Mac Farland.

Foram feitas diluições decimais deste conjunto de bactérias diluindo-se 0,6 mL da mistura em 5,4 mL de leite integral estéril até chegar à diluição de 10^{-12} .

De cada diluição foi realizado o plaqueamento em profundidade adicionando-se 1 mL da diluição em placas de Petri vazias, estéreis e em triplicata e em seguida o APC. Posteriormente à solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas à 35° C durante 48 horas.

O leite UHT integral estéril foi obtido a partir da esterilização do leite UHT integral em autoclave vertical sob vapor fluente à 121° C por 5 minutos. Após a esterilização foi feita a contagem padrão em placas para verificar a eficiência da

autoclavação. Foi inoculado 1 mL do leite UHT estéril integral em placas de Petri estéreis, vazias e em triplicata. Adicionou-se 12 mL de APC e posteriormente foi realizada a homogeneização. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas à 35° C por 48 horas.

3.6 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO LEITE

Foram realizadas 16 contaminações experimentais distintas conforme pode ser observado no quadro 1.

Quadro 1: Adições realizadas ao leite integral

Contaminações	Adições realizadas ao leite UHT integral		
1A	EHEC (10^{-8})	-	-
1B	EHEC (10^{-7})	-	-
1C	EHEC (10^{-6})	-	-
1D	EHEC (10^{-5})	-	-
2A	EHEC (10^{-8})	“Pool” (10^{-9})	-
2B	EHEC (10^{-7})	“Pool” (10^{-8})	-
2C	EHEC (10^{-6})	“Pool” (10^{-7})	-
2D	EHEC (10^{-5})	“Pool” (10^{-6})	-
3A	EHEC (10^{-8})	-	Azidiol
3B	EHEC (10^{-7})	-	Azidiol
3C	EHEC (10^{-6})	-	Azidiol
3D	EHEC (10^{-5})	-	Azidiol
4A	EHEC (10^{-8})	“Pool” (10^{-9})	Azidiol
4B	EHEC (10^{-7})	“Pool” (10^{-8})	Azidiol
4C	EHEC (10^{-6})	“Pool” (10^{-7})	Azidiol
4D	EHEC (10^{-5})	“Pool” (10^{-6})	Azidiol

Legenda: “Pool” = conjunto de bactérias composto por *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. typhi*.

Para a contaminação experimental 1A e 2A adicionou-se 1 mL da diluição 10^{-8} da EHEC que foi a primeira diluição em que se obteve a extinção celular (0 UFC/mL) à 24 mL e à 23 mL de leite UHT integral, respectivamente.

Nas contaminações 1B e 2B foi adicionado 1 mL da diluição 10^{-7} (1 UFC/mL) da EHEC à 24 mL e à 23 mL de leite UHT integral, respectivamente.

Inoculou-se 1 mL da diluição 10^{-6} (10 UFC/mL) da EHEC à 24 mL e à 23 mL de leite UHT integral, respectivamente, para realizar as contaminações 1C e 2C.

Nas contaminações 1D e 2D inoculou-se 1 mL da diluição 10^{-5} (100 UFC/mL) da EHEC à 24 mL e à 23 mL de leite UHT integral, respectivamente

Além disso, nas contaminações 2A, 2B, 2C e 2D também foi adicionado 1 mL da diluição 10^{-9} (0 UFC/mL), da diluição 10^{-8} (1 UFC/mL), da diluição 10^{-7} (10 UFC/mL) e da diluição 10^{-6} (100 UFC/mL) do conjunto de bactérias, respectivamente. O volume final de 25 mL das 8 contaminações (1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 2B, 2C e 2D) foi inoculado em frascos contendo 225 mL de caldo EC.

Para as contaminações 3A, 3B, 3C e 3D foram adicionados 2,0 mL das diluições 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} de EHEC, respectivamente à 48 mL de leite UHT integral em frascos contendo um comprimido de azidiol. O volume final de 50 mL de leite contaminado foi adicionado à 450 mL de caldo EC.

As contaminações 4A, 4B, 4C e 4D foram realizadas, adicionando-se 2,0 mL das diluições 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} de EHEC e 2,0 mL das diluições 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} do conjunto de bactérias, respectivamente à 46 mL de leite UHT integral. O volume final de 50 mL foi inoculado em 450 mL de caldo EC.

Os frascos com caldo EC e com o leite contaminado experimentalmente foram incubados em estufa à 35°C durante 24 horas.

3.6.1 Armazenamento do leite contaminado artificialmente

Para cada contaminação foi realizado dois tipos de armazenamento: refrigeração (4°C) e congelamento (-18°C).

Após a incubação dos frascos contendo caldo EC e o leite contaminado experimentalmente, alíquotas de 1 mL de cada contaminação foram colocadas em eppendorfs previamente identificados.

As alíquotas destinadas à refrigeração foram mantidas em refrigerador à temperatura de 4°C . Já as destinadas à congelamento foram estocadas à -18°C até o

momento da realização da extração do DNA, da Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e da semeadura em Placas RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes.

3.7 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Para o cultivo bacteriológico foi realizada a CBHAM nas amostras resfriadas por 4 e 7 dias e nas amostras congeladas por 15, 30, 60 e 120 dias. A metodologia utilizada foi a metodologia descrita pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003). Utilizou-se a técnica de plaqueamento em profundidade, inoculando-se 1 mL da amostra em placas de Petri vazias, estéreis e em triplicata. Em seguida, adicionou-se de 12 a 15 mL de APC. Posteriormente à solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas à 35° C durante 48 horas.

Estas amostras também foram semeadas, em triplicata, em Placas RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes (R-Biopharm AG, Alemanha). A semeadura, a incubação e a leitura foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 PRIMERS UTILIZADOS

Para a identificação da *E. coli* O157:H7 foram utilizados os seguintes primers: Stx2Af-5'-CGAGGGCTTGATGTCTATCAG-3' e Stx2Ar-5'-TCAGTATAACGGCCACAGTCC-3' descritos por Park; Lee; Kim (2006).

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

As extrações dos DNA bacterianos foram realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto Biomédico da UFF utilizando o kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification - Promega, Madison, WI e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Estas extrações foram feitas nos seguintes dias: 4^o e 7^o dias de resfriamento, 15^o, 30^o, 60^o e 120^o dias de congelamento. O material extraído foi conservado à -20°C até o momento do seu uso.

3.10 PCR

Para as reações da PCR, utilizamos 2µl (microlitro) da amostra de DNA extraído, 20pmol (picomol) dos *primers* (Síntese biotecnologia), 25µl do mix de PCR (Promega® PCR Master Mix) completos com água DEPC, para um volume final de 50 µL.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler® Gradiente, Eppendorf) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 61°C por 35 segundos e 72°C por 35 segundos, e finalizado por um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% e corados em brometo de etídio. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por transiluminação do gel em luz ultravioleta e estes foram fotodocumentados para posterior análise.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado, na análise dos resultados, o Teste do Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% (VIEIRA, 2010), tendo como objetivo verificar se houve diferença significativa na detecção da *E. coli* O157:H7 em virtude dos métodos de detecção utilizados, dos diferentes tipos de contaminações realizadas e pelo uso do azidiol. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 para a realização da análise estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 Leite UHT integral

As amostras de leite UHT integral apresentaram o teor de acidez titulável de 0,16 gramas de ácido láctico em 100 mL de leite, estando em conformidade com o parâmetro preconizado pela Portaria nº 370 de 04 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997).

Quanto à CBHAM, não foi observado o crescimento de colônias, estando dentro do regulamentado pela RDC 12/2001 (BRASIL, 2001).

4.1.2 Frasco com comprimido de azidiol

Não foi observado o crescimento de colônias na CBHAM. Sendo assim, o frasco contendo o conservante estava apto para ser utilizado no presente trabalho.

4.2 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Quanto ao cultivo bacteriológico, na CBHAM e nas placas RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes, das amostras resfriadas durante 4 e 7 dias foi verificado o crescimento de colônias em todas as amostras por ambas as técnicas. Já no cultivo das amostras congeladas durante 15 dias, foi observado o crescimento de colônias em todas as placas quando utilizado a CBHAM.

Após 30 dias de congelamento, na CBHAM, somente as placas correspondentes às contaminações 1D, 2D, 3D e 4D apresentaram o crescimento de

colônias. Em contrapartida, nas placas RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes não foi observado o crescimento de colônias nas amostras. Estatisticamente, pelo Teste do Qui-quadrado ($p \leq 0,05$), os resultados da técnica de CBHAM e das placas RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes não diferiram significativamente.

Quanto ao cultivo bacteriológico das amostras após 60 e 120 dias de congelamento, em nenhuma das técnicas utilizadas, foi verificado o crescimento de colônias. Este resultado foi diferente do resultado descrito por Ansay e Kaspar (1997) que detectaram a bactéria em leite contaminado artificialmente e congelado. A detecção foi possível até o 63^o dia de congelamento à -20°C por meio da metodologia tradicional.

Resultado diferente foi relatado por Kawasaki et al. (2009) que detectaram a *E. coli* O157:H7 em amostras de leites contaminados armazenados durante 60 dias através da metodologia tradicional.

O congelamento e o resfriamento são situações de estresse as quais as bactérias foram submetidas. Tais situações podem ter induzido as bactérias a entrarem no estado fisiológico VNC, onde as células estão metabolicamente ativas, porém não possuem a capacidade de se desenvolver normalmente nos meios de cultura utilizados na metodologia tradicional. E, por isso, não foi possível fazer a sua detecção em algumas amostras congeladas. Além disso, a técnica de CBHAM só possui a capacidade de detectar os microrganismos viáveis cultiváveis.

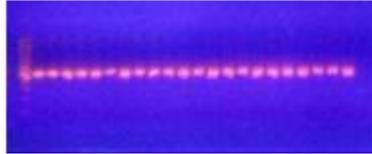
De acordo com Ansay, Darling e Kaspar (1999) o congelamento rápido de alimentos como a carne moída inoculada com *E. coli* O157:H7 reduz o número de microrganismos em $1,0 \log_{10}$ UFC/g. A *E. coli* O157:H7 é prejudicada pelo congelamento pela inativação térmica de suas células (ZHAO et al., 2004).

4.3 PCR

A figura 1 ilustra os resultados referentes à PCR das amostras armazenadas durante 4 e 7 dias de resfriamento e 15 dias de congelamento. A última amostra é o controle negativo. As bandas estão semelhantes em intensidade sem sinal de produtos inespecíficos.

FIGURA 1: Fotografia do gel de agarose a 1,5% da PCR referentes às amostras armazenadas durante 4 e 7 dias de resfriamento e 15 dias de congelamento.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

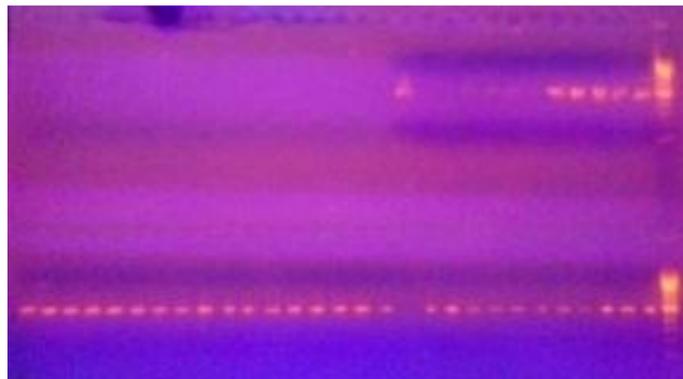


Linha 1: peso molecular 100pb
 Linhas 2 a 21: amostras clínicas
 Linha 22: controle positivo
 Linha 23: controle negativo

A figura 2 representa o gel de agarose a 1,5% com os resultados da PCR das amostras armazenadas congeladas durante 30 e 60 dias e das diluições 10^{-16} , 10^{-17} , 10^{-18} , 10^{-19} e 10^{-20} . Na fileira inferior todas as amostras foram positivas, excetuando-se o controle negativo na fileira 18. Além disso, na fileira superior apenas a diluição 10^{-20} e o controle negativo foram negativos. Estes resultados referentes às diluições demonstram que a diluição seriada está correta.

FIGURA 2: Fotografia do gel de agarose a 1,5% da PCR referentes às amostras armazenadas durante 30 e 60 dias de congelamento e às diluições 10^{-16} , 10^{-17} , 10^{-18} , 10^{-19} e 10^{-20} .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 28 29 30



Linhas inferiores 1 a 16: amostras clínicas
 Linha inferior 17: controle positivo
 Linha inferior 18: controle negativo
 Linhas inferiores 19 a 29: amostras clínicas
 Linha inferior e superior 30: peso molecular 100pb

Após 120 dias de congelamento todas as amostras foram positivas para a pesquisa de *E. coli* O157:H7 na PCR.

A técnica da PCR foi capaz de detectar o DNA da *E. coli* O157:H7 até a diluição 10^{-19} . Com a técnica convencional de CBHAM foi possível a visualização e enumeração de colônias até a diluição 10^{-8} . Estes resultados demonstram que a PCR apresentou uma maior sensibilidade quando comparada a técnica de CBHAM.

O teste do Qui-quadrado ($p \leq 0,05$) demonstrou que houve diferença significativa entre as técnicas utilizadas para a detecção do microrganismo.

Apesar do azidiol ser um conservante bacteriostático, não foi observada nenhuma interferência do conservante na reação de PCR. Os produtos gerados pela reação de amplificação das amostras com o conservante foram os produtos esperados. Não houve a produção de produtos inespecíficos. Este resultado pode ser justificado pelo fato da PCR não ter a capacidade de diferenciar as células viáveis das células não-viáveis.

De acordo com o teste do Qui-quadrado não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) na detecção da bactéria entre as amostras com azidiol e as amostras sem o conservante conforme pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2: Resultados do Teste do Qui-quadrado referentes à influência da presença do azidiol na detecção de *E. coli* O157:H7

Técnica	CBHAM	RIIDA	PCR
Qui-quadrado	$p = 0,5819$	$p = 0,5856$	$p = 0,5010$

$p > 0,05$: os resultados das amostras com o conservante não diferiram estatisticamente dos resultados das amostras sem o conservante.

Quanto aos tipos e ao tempo de armazenamento das amostras, a PCR foi capaz de detectar a *E. coli* O157:H7 em todas as condições. Tanto o congelamento quanto o resfriamento não foram obstáculos para a detecção do microrganismo, assim como o tempo de estocagem reforçando a função de conservação do congelamento e do resfriamento. Não houve diferença significativa nos resultados em virtude do tipo e do tempo de armazenamento das amostras.

Resultado diferente foi relatado por Kawasaki et al. (2009) que fizeram a pesquisa da bactéria em amostras de carne, leite, ovo, salmão, queijo fresco, alface e presunto cru congeladas após 2 semanas e 2 meses utilizando a mPCR e a metodologia tradicional. Os pesquisadores observaram que a detecção do microrganismo diminuiu ao analisarem as amostras referentes à 2 meses de congelamento pela mPCR.

Além disso, a mPCR apresentou maior sensibilidade na detecção de *E. coli* O157:H7 do que a metodologia tradicional (KAWASAKI et al., 2009) sendo este resultado semelhante ao observado neste trabalho.

Não foi observada nenhuma diferença significativa pelo Teste do Qui-quadrado na detecção da bactéria entre as amostras contaminadas somente com *E. coli* O157:H7 e as amostras contaminadas com EHEC e com o conjunto de bactérias, divergindo do resultado encontrado por Garcia et al. (2008). Os pesquisadores relataram que a mPCR apresentou uma menor sensibilidade na detecção de *E. coli* O157:H7 quando utilizada em amostras de leite com alta contaminação bacteriana. Entretanto, Hu, Zhang e Meitzler (1999) relataram que não houve interferência da microbiota bacteriana presente nas fezes de bovinos durante a reação de mPCR.

Os resultados deste trabalho confirmaram a especificidade dos *primers* para a detecção de *E.coli* O157:H7 desenvolvidos por Park, Lee e Kim (2006). No presente experimento, o gene Stx2A utilizado para a detecção do microrganismo está envolvido na biossíntese dos antígenos somáticos O157 e flagelar H7 caracterizando a especificidade dos *primers* (HU; ZHANG; MEITZLER, 1999).

Segundo Phuektes et al. (2003), a sensibilidade das técnicas de PCR tende a ser maior do que a do cultivo bacteriano tradicional. Esta característica permite realizar a detecção de um número pequeno de microrganismos.

No presente experimento, a etapa de pré-enriquecimento em meio seletivo favoreceu o aumento da sensibilidade da técnica por oferecer condições favoráveis ao crescimento da *E. coli* O157:H7. De acordo com Uyttendaele et al. (1998) é necessário realizar o enriquecimento da amostra para que a PCR consiga fazer a

detecção da bactéria que passou por um processo de congelamento e que encontra-se injuriada.

Embora alguns pesquisadores afirmem que a presença da gordura do leite pode influenciar na extração do DNA e conseqüentemente na PCR (RAMESH et al., 2002; ASLAM; HOGAN; SMITH, 2003), não foi observada nenhuma interferência da matéria gordurosa na mPCR. Entretanto, esta observação pode ter sido feita, em virtude, de apenas ter sido utilizado neste experimento o leite integral sem a comparação com leite desnatado.

5 CONCLUSÃO

A PCR apresentou uma maior sensibilidade para a detecção da *E. coli* O157:H7 em leite UHT integral contaminado artificialmente quando comparada com a CBHAM e com o kit comercial RIDA[®] COUNT *Escherichia coli*/Coliformes. O tempo e a temperatura de estocagem, assim como o azidiol e a presença de outros grupos de bactérias não influenciaram na detecção da *E.coli* O157:H7 pela PCR.

Sendo assim, a PCR pode ser aplicada na pesquisa de *E.coli* O157:H7 em amostras de leite integral resfriadas, congeladas e adicionadas de azidiol corroborando a alta sensibilidade da técnica para a pesquisa da bactéria.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; ALEGRE, I.; OLIVEIRA, M.; ALTISENT, R.; VIÑAS, I. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrots and escarole) stored under different conditions. *Food Control*. v.27, p.37-44, 2012.

ABDUL-RAOUF, U.M.; AMMAR, M.S.; BEUCHAT, L.R. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *International Journal of Food Microbiology*. v.29, p.423-426, 1996.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. *Food Microbiology*. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. 490 p.

ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.; KAMINJOLO, J.S. Prevalence and characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from milk and feces of cows on dairy farms in Trinidad. *Journal of Food Protection*. v.60, p.1174-1181, 1997.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*. v.3, p.285-293, 1997.

ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. v.25, p.131-134, 1997.

ANSAY, S.E.; DARLING, K. A.; KASPAR, C. W. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15°C and then -2°C and -20°C. *Journal of Food Protection*. v.62, p.1243-1247, 1999.

ARIMI, S.M.; KOROTI, E.; KANG'ETHE, E.K.; OMORE, A.O.; MCDERMOTT, J.J. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Tropica*. v.96, n.1, p.1-8, 2005

ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; GLENN-MORRIS, J. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews*. v.18, n.1, p.29-51, 1996.

ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. v.61, p.2037-2039, 1995.

ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in milk. *Food Microbiology*. v.20, p.345-350, 2003.

BASTOS, P.A.M.B. *Sobrevivência de Escherichia coli O157:H7 em iogurtes*. Niterói, 2009. 84 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2009.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.E.; CAPPELIER, J.M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. v.31, n.1, p.77-81, 2000.

BORCZYK, A.A.; KAMALI, M.A.; LIOR, H.; DUNCAN, L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. v.1, p.98, 1987.

BOTTERO, M.T.; DALMASSO, A.; SOGLIA, D.; ROSATI, S.; DECASTELLI, L.; CIVERA, T. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Molecular and cellular probes*. v.18, p.283-288, 2004.

BRASIL. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UHT. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 04 de setembro de 1997. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 14 dez. 2006.

BYRNES, J.J.; MOAKE, J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the haemolytic-uraemic syndrome: evolving concepts of pathogenesis and therapy. *Clinical Haematology*. v.15, n.2, p.413–442, 1986.

CASTRO, J.F.; PINTO, F.A.; RODRIGUES, R.; LEITE, M.O.; SILVEIRA, J.C.; FONSECA, L.M. Uso do azidiol comprimido como conservante do leite cru destinado a contagem bacteriana por citometria de fluxo. 2006. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p021.pdf>> Acesso em: 01 nov 2011.

CAWTHORN, D.M.; WITTHUHN, R.C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology*. v.105, n.4, p.1178-1185, 2008.

CEBULA, T.A.; PAYNE, W.L.; FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. v.33, n.1, p.248-250, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheeses curds – Wisconsin, June 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v.49, n.40, p.911-913, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Escherichia coli* O157:H7 Infections in Children Associated with Raw Milk and Raw Colostrum From Cows - California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v.57, n.23, p.625-628, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5723a2.htm>>. Acesso em: 13 ago. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/index.html>> Acesso em: 17 ago. 2011.

CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Aplicação da técnica de Rep-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha para o monitoramento da qualidade do leite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.43, n.3, p.309-320, 2006.

CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v.5, p.52-64, 2006.

CONEDERA, G.; DALVIT, P.; MARTINI, M.; GALIERO, G.; GRAMAGLIA, M.; GOFFREDO, E.; LOFFREDO, G.; MORABITO, S.; OTTAVIANI, D.; PATERLINI, F.; PEZZOTI, G.; PISANU, M.; SEMPRINI, P.; CAPRIOLI, A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and dairy products in Italy. *Internacional Journal of Food Microbiology*. v.96, n.1, p.67-73, 2004.

D'AOUST, J.Y.; PARK, C.E.; SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; EMMONS, D.B.; MCKELLAR, R.C. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica* and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science*. v.71, p.3230-3236, 1988.

DEISINGH, A.K.; THOMPSON, M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*. v.96, p.419-429, 2004.

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

DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. v.53, n.10, p.2394-2396, 1987.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. v.12, n.4, p. 289-302, 1991.

FAITH, N.G.; SHERE, R.; BROSCHE, K.W.; ARNOLD, S.E.; ANSAY, J.B.; KASPAR, W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, p.1519-1525, 1996.

FAO /WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Risk profile for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and porks. In: *JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME /CODEX COMMITTEE ON FOOD HIGIENE*, 35, 2003, Orlando. *Circular...* Orlando: Codex Alimentarius commission, 2003. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/report/117/AI0313ae.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2011.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Escherichia coli* O157:H7. In: _____. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acesso em: 13 ago. 2011.

FLORESTA, F.A. *Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em Salmonella e Escherichia coli*. Viçosa, 2006. 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

FODE-VAUGHAN, K.A.; MAKI, J.S.; BENSON, J.A.; COLLINS, M.L.P. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. v.37, p.239-243, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo:Atheneu, 2008. 182p.

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

GARNICA, M.L.; SANTOS, J.S.; GONZALO, C. Short communication: Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *Journal of Dairy Science*. v.94, n.4, p.1922-1927, 2011.

GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science*. v.86, n.1, p.138-145, 2003.

GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPANICOLAOU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows milk yogurt and ewes' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*. v. 69, p.655- 660, 2002.

GRANT, JULIANA; WENDELBOE, A.M.; WENDEL, A.; JEPSON, B.; TORRES, P.; SMELSER, C.; ROLFS, R.T. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. v.14, n.10, p.1633-1637, 2008.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology Review*. v.13, p.60-98, 1991.

HANCOCK, D.; BESSER, T.; LEJEUNE, J.; DAVIS, M.; RICE, D. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*. v.66, n.1-2, p.71-78, 2001.

HENTGES, D.; SILVA, D.T.; ZONTA, M.N.; DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; TIMM, C.D. Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em doce de leite. In: 2º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2., 2008, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves, 2008.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HOLLAND, P.M.R.D.; ABRAMSON, R.W.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 59339 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 88, p.7276–7280, 1991.

HONISH, L.; PREDY, G.; HISLOP, N.; CHUI, L.; GROCHOWSKA, K.K.; TROTTIER, L.; KREPLIN, C.; ZAZULAK, I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*. v.96, n.3, p.182-184, 2003.

HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, n.6, p.867-876, 1999.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. Microbiological Testing in food safety management. Kluwer Academic, New York. 2002.

JATOBÁ, R.B. *Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactcount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado*. Recife, 2009. 47 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. v.25, n.6 ,p.745-761, 2008.

KARNS, J.S.; VAN KESSEL, J.S.; MCCLUSKY, B.J.; PERDUE, M.L. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. v.90, n.7, p.3212-3219, 2007.

KAWASAKI, S.; FRATAMICO, P.M.; HORIKOSHI, N.; OKADA, Y.; KAZUKO, T.; SAMESHIMA, T.; KAWAMOTO, S. Evaluation of a Multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathogens and Disease*. v.6, n.1, p.81-89, 2009.

KEENE, W.E.; HEDBERG, K.; HERRIOTT, D.E.; HANCOCK, D.D.; MCKAY, R.W.; BARRETT, T.J.; FLEMING, D.W. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by distributed raw milk. *The Journal of Infectious Diseases*. v.176, p.815-818, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. *Diagnóstico Microbiológico*. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

LAHTI, E.; EKLUND, M.; RUUTU, P.; SIITONEN, A.; RANTALA, L.; NUORTI, P.; HONKANEN-BUZALSKI. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v.21, p.189-195, 2002.

LAMPEL, A.K.; ORLANDI, P.A.; KORNEGAY, L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.10, p.4539-4542, 2000.

LEITE, M.O. *Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol*. Belo Horizonte, 2006. 62 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

LI, Y.; ZHUANG, S.; MUSTAPHA, A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. *Meat Science*. v.71, p.402-406, 2005.

LICENCE, K.; OATES, K.R.; SYNGE, B.A.; REID, T.M.S. An outbreak of *E. coli* O157:H7 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiology Infection*. v.126, p.135-138, 2001.

LIOR, H. C. *E. coli* O157:H7 and verotoxigenic *E. coli*. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. v.13, n.10, p.592, 1993.

LIPTAKOVA, A.; SIEGFRIED, L.; ROSOCHA, J.; PODRACKA, L.; BOGYIOVA, E.; KOTULOVA, D. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurized cow's milk in Slovakia. *Clinical Microbiology and Infection*. v.10, n.6, 2004.

MAKINO, S.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.12, p.5536-5539, 2000.

MARCH, S.B.; RATMAN, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. v.23, p.869-872, 1986.

MAREK, P.; NAIR, M.K.M.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*. v.94, p.1-7, 2004.

MALORNY, B.; PANAYOTIS, T.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. v.83, n.1, p.39-48, 2003.

MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, J.G.; POTTER, M.E.; HEDBERG, K.; WACHSMUTH, K.; TAUXE, R.V.; DAVIS, J.P.; ARNOLDI, J.; TILLELI, J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uremic syndrome. *Lancet*. v.2, p.1043, 1986.

MASSA, S.; GOFFREDO, E.; ALTIERI, C.; NATOLA, K. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8°C. *Letters in Applied Microbiology*. v.28, p.89-92, 1999.

MECHIE, S.C.; CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiology and Infection*. v.188, p.17-25, 1997.

MELLIES, J.L.; BARRON, A.M.S.; CARMONA, A.M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and Immunity*. v.75, n.9 p.4199–4210, 2007.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: _____ *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2. ed. Washington: ASM, 2001, p.141-77.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einsten*. v.2, n.2, p.139-142, 2004.

MORGAN, D; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N.; WALTER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Vertoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated to consumption of yogurt. *Epidemiology and Infection*. v.11, p.181-187, 1993.

MULEC, J.; KRISTUFEK, V.; CHRONAKOVÁ, A. Comparative microbial sampling from eutrophic caves in Slovenia and Slovakia using RIDA® COUNT test kits. *International Journal of Speleology*. v.41, n.1, p.1-8, 2012.

NAKAGAWA, H.; HARA-KODO, Y.; KOJIMA, T.; IKEDO, M.; KODAKA, H.; KONUMA, H.; KUMAGAI, S. Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. *Internacional Journal of Food Microbiology*. v.60, p.107-110, 2000.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. v.11, p.142-201, 1998.

NEILL, M.A. *E. coli* O157:H7 time capsule: what do we know and when did we know? *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. v.14, p.374-377, 1994.

NOGVA, H.K.; RUDI, K.; NATERSTAD, K.; HOLCK, A.; LILLEHAUG, D. Application of 5'-Nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.10, p.4266-4271, 2000.

O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Producing of *Shigella dysenteriae* type-1 like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. v.146, p.763-769, 1982.

OLIVER, J.D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*. v.57, n.9, p.2640-2644, 1991.

PADHYE, N.V.; M.P. DOYLE. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*. v.55, n.7, p.555-565, 1992.

PARK, Y.S.; LEE, S.R.; KIM, Y.G. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *The Journal of Microbiology*, v.44, n.1, p.92-97, 2006.

PARMA, A.E.; SANZ, M.E.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; VIÑAS, M.R.; BLANCO, M.; PADOLA, N.L.; ETCHEVERRIA, A.I. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *European Journal of Epidemiology*. v.16, p.757-762, 2000.

PHUEKTES, P.; BROWNING, G.F.; ANDERSON, G.; MANSELL, P.D. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *Journal of Dairy Research*. v.70, n.2 p.149-155, 2003.

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

POWELL, H.A.; GOODING, C.M.; GARRETT, S.D.; LUND, B.M.; MCKEE, R.A. Proteinase Inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. v.18, n.1, p.59-61, 1994.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARAJ, M.C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes*. v.16, N.4, p.307-314, 2002.

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

RENTER, D.G.; SARGEANT, J.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments. *Animal Health Research Reviews*. v.3, n.2, p.83-94, 2002.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OKOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *The New England Journal of Medicine*. v.308, p.681-685, 1983.

ROLLINS, M.D.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*. v.52, n.3, p.531-538, 1986.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. v.17, n.1, p.37-45, 1992.

ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.12 p. 2889-2983, 1987.

SALO, S.; EHAVALD, H.; RAASKA, L.; VOKK, R.; WIRTANEN, G. Microbial surveys in Estonian dairies. *Food Science and Technology*. v.39, n.5, p.460-471, 2006.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 2007. 533p.

SOEJIMA, T.; IIDA, K.; QIN, T.; TANIAI, H.; SEKI, M.; YOSHIDA, S. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. v.46, n.7, p.2305-2313, 2008.

SPANNO, G.; GOFFREDO, E.; BENEDEUCE, L.; TARANTINO, D.; DUPUY, A.; MASSA, S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology*. v.36, p.73-76, 2003.

THOLOZAN, J.L.; CAPPELIER, J.M.; TISSIER, J.P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. v.65, n.3, p.1110-1116, 1999.

TREVENA, W.B; HOOPER, R.S; WRAY, C.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; DOMINQUE, G. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *The Veterinary Record*. v.138, n.16, p.400, 1996.

UYTTENDAELE, M.; GRANGETTE, C.; ROGERIE, F.; PASTEAU, S.; DEBEVERE, J.; LANGE, M. Influence of cold stress on the preliminary enrichment time needed for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, n.5, p.1640–1643, 1998.

UPTON, P.; COIA, J. Outbreak of *Escherichia coli* 0157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet*. v.344, p.1015, 1994.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química nova*. v.25, n.4, p.609-615, 2002.

VERSALOVICK, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods of Cellular and Molecular Biology*, New York, v.5, p.25-40, 1994.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. v.42, n.4, p.1787-1789, 2004.

VIEIRA, S. *Bioestatística: tópicos avançados*. 3.ed. São Paulo: Elsevier, 2010. 288p.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. v.60, n.6, p.610-613, 1997.

WILSON, J.B.; CLARKE, R.C.; RENWICK, S.A.; RAHN, K.; JOHNSON, R.P.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; ALVES, D.; GYLES, C.L.; SANDHU, K.S.; MCEWEN, S.A.; SPIKA, J.S. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *Journal of Infectious Diseases*. v.174, p.1021-1027, 1996.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.

YAMAGUCHI, N.; SASADA, M.; YAMANAKA, M.; NASU, M. Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometri*. v.54, n.1, p.27-35, 2003.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; KEMP, M.C.; HOWELL, R.S.; ZHAO, P. Influence of freezing and freezing plus acidic calcium sulfate and lactic acid addition on thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*. v.67, n.8, p.1760-1764, 2004.

