

Universidade Federal de Juiz de Fora

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

JULIANA FRANÇA MONTEIRO DE MENDONÇA

**DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Salmonella* spp. E
Staphylococcus aureus EM QUEIJO DE COALHO PELA TÉCNICA
DE PCR EM TEMPO REAL**

Juiz de Fora

2016

JULIANA FRANÇA MONTEIRO DE MENDONÇA

**DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Salmonella* spp. E
Staphylococcus aureus EM QUEIJO DE COALHO PELA TÉCNICA
DE PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Marta Fonseca Martins

Co-orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendonça, Juliana França Monteiro de.
Detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. e
Staphylococcus aureus em Queijo de Coalho pela técnica de PCR
em Tempo Real / Juliana França Monteiro de Mendonça. -- 2016.
70 p. : il.

Orientadora: Marta Fonseca Martins
Coorientador: João Batista Ribeiro
Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal
de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,
2016.

1. Doenças Transmitidas por Alimentos. 2. Derivados
Lácteos. 3. Micro-organismos patogênicos. 4. Viabilidade
Celular. 5. Intercalantes de DNA. I. Martins, Marta Fonseca,
orient. II. Ribeiro, João Batista, coorient. III. Título.

**DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Salmonella* spp. E
Staphylococcus aureus EM QUEIJO DE COALHO PELA TÉCNICA
DE PCR EM TEMPO REAL**

JULIANA FRANÇA MONTEIRO DE MENDONÇA

ORIENTADOR (A): Dra. Marta Fonseca Martins

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 26/02/2016.

Dra. Isabela Fonseca

Prof. Dr. João Batista Ribeiro
Co-orientador

Prof. Dra. Marta Fonseca Martins
Orientadora

Juiz de Fora
2016

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Clovis e Valéria, por serem meu
exemplo de vida e por sempre
acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG e ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço ao Convênio Embrapa/Monsanto por me conceder a bolsa para que pudesse me dedicar inteiramente à esse projeto e financiar este trabalho.

Agradeço também à Embrapa Gado de Leite, por permitir que eu realizasse meu experimento em suas dependências, e a todos os colaboradores, que sempre me receberam com muito carinho e respeito.

Agradeço muito a todos os meus amigos do Laboratório de Genética Molecular “Mario Luiz Martinez” - Embrapa por compartilharem comigo conhecimento, alegrias, vitórias... sem vocês eu nunca conseguiria chegar até aqui, tenham certeza disso! Fico muito feliz pela equipe maravilhosa que formamos, pois em uma sociedade tão egoísta e competitiva, nós nos sentimos felizes em compartilharmos conhecimento, experiências, vitórias, vidas... muito obrigada a todos! Em especial gostaria de agradecer ao Felipe Vieira, meu parceiro de bancada, e a Isabela Fonseca, uma grande amiga. Sem você Felipe, não faria nem metade do que fiz. E realmente formamos uma dupla fantástica! A você, Isabela, quero agradecer por tudo o que me ensinou (algumas coisas até mais de uma vez), por sua paciência, companheirismo e amizade. Com você aprendi que uma pessoa brilhante não precisa brilhar mais do que as outras, aprendi que a humildade é tudo.

Agradeço muito à minha orientadora, Dra. Marta Martins, por acreditar e confiar em mim. Obrigada por todos os ensinamentos técnicos e pessoais que, com certeza, acrescentaram muito em minha vida e dos quais me lembrarei sempre. E muito obrigada por enxergar em mim um potencial que nem eu mesma sabia que tinha.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. João Batista Ribeiro, por toda a sua paciência em me ensinar, compreensão e disposição em me ajudar sempre que encontrava questões difíceis pelo caminho, tanto pessoais quanto profissionais.

Agradeço à Dra. Edna Froeder Arcuri e à Dra. Maria de Fátima Borges por, mesmo à distância, me acompanharem em meus experimentos e estarem sempre dispostas a me ajudar em todos meus questionamentos técnicos.

Agradeço muito a toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Leite, a Dra. Carla Lange e a Dra. Maria Aparecida Brito muito obrigada por me permitirem usar o laboratório, sem restrições, todas as vezes que precisei. Marcos, obrigada por toda sua ajuda e paciência sempre. Selda, obrigada por se tornar uma amiga e companheira, compartilhando comigo desde as angústias de um experimento frustrado até a mais sublime alegria da vida.

Agradeço imensamente ao Cristiano Borges por ser sempre tão solícito e paciente comigo todas as vezes que eu pedia “só mais uma” análise estatística.

Agradeço aos meus amigos da Primeira Igreja Batista em Juiz de Fora, em especial minhas companheiras do Berçário, por comemorarem comigo cada vitória, chorarem comigo cada derrota e por me sustentarem em oração.

Agradeço a todos os meus familiares, avós, tios e primos por me apoiarem e por entenderem todos os momentos em que estive ausente. Vocês são incríveis!

Agradeço imensamente à minha família por sempre estarem ao meu lado em todas as minhas vitórias e derrotas. Aos meus pais, Clovis e Valéria, por me oferecerem um lar com muito amor, carinho, companheirismo e respeito. Tudo o que eu sou hoje eu devo a vocês dois. Muito obrigada! Aos meus irmãos, Gustavo e Mariana, por compartilharem comigo as experiências da vida e me ouvirem sempre que necessário. Às minhas sobrinhas, Manuela, Débora e Giovana, por serem a razão de tantas alegrias em nossa casa e me fortalecerem todos os dias com um simples sorriso. Ao meu esposo, Jardel, por dividir comigo sua vida e me apoiar sempre que preciso. Tenho certeza que todos nós, juntos, formamos uma incrível “grande família” e eu amo todos vocês demais!

Agradeço, principalmente, Àquele que me deu o fôlego de vida, que me sustenta e me fortalece a cada dia: meu Deus, “porque nEle eu vivo, e me movo e existo...” (At 17.28).

"Para ser sábio, é preciso primeiro temer a Deus, o Senhor. Os tolos desprezam a sabedoria e não querem aprender"

Provérbios 1.7

RESUMO

Em muitos casos, o leite e seus derivados são responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos pela veiculação de micro-organismos, como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. A contaminação desses produtos pode ocorrer, principalmente, devido ao processamento térmico ineficiente ou à falta de observação das práticas de higiene e limpeza durante as diversas etapas do processo produtivo, como na manipulação do alimento ou, até mesmo, após o tratamento térmico. Assim, a identificação rápida de patógenos presentes em alimentos é de extrema importância, tanto para a garantia da qualidade dos produtos, quanto em casos de surtos. Nestes casos o uso de métodos altamente sensíveis e específicos para detectar patógenos alimentares se torna indispensável. Uma das técnicas que tem sido utilizada para este fim é a PCR em Tempo Real (qPCR), devido a sua rapidez e eficiência na identificação de patógenos em alimentos. Contudo, uma das grandes desvantagens dessa técnica é a sua incapacidade em diferenciar o DNA de células viáveis e inviáveis dos patógenos. Para suplantar tal ponto, o brometo de etídeo monoazida (EMA) pode ser usado para detectar somente células viáveis. O EMA é um intercalante de DNA que pode entrar seletivamente em células com membrana danificada (consideradas inviáveis) e se ligar covalentemente ao seu DNA, quando exposto à luz halógena, inibindo sua amplificação durante a qPCR. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para detecção em *multiplex* de células viáveis de *Salmonella* spp. e *S. aureus* em culturas puras e em Queijo de Coalho pelo uso do EMA combinado à qPCR. O protocolo estabelecido foi eficaz para a identificação de células viáveis de *Salmonella* spp., tanto em culturas puras quanto em Queijo de Coalho. Entretanto, foi observado que a diferenciação de células viáveis e inviáveis de *S. aureus* pelo uso do EMA não foi eficiente. Portanto, não foi possível realizar a detecção de células viáveis dos patógenos em *multiplex* em culturas puras e em Queijo de Coalho. Além disso, observou-se que o protocolo estabelecido, combinando a técnica de qPCR aliada ao uso do EMA, foi capaz de detectar concentrações tão baixas de células viáveis de *Salmonella typhimurium* quanto 10^1 UFC/10g de Queijo de Coalho. Contudo, somente foi possível diferenciar estatisticamente as médias dos valores de *Cycle threshold* (C_t) em concentrações de células superiores a 10^3 UFC/10 g de queijo. O protocolo desenvolvido é, portanto, uma ferramenta útil para a vigilância de alimentos, uma vez que fornece identificação rápida e específica de células viáveis de *Salmonella* spp. em Queijo de Coalho.

Palavras chave: Doenças Transmitidas por Alimentos. Derivados Lácteos. Micro-organismos patogênicos. Viabilidade Celular. Intercalantes de DNA.

ABSTRACT

In many cases, milk and milk products are responsible to cause foodborne illness through transmission of microorganisms, like *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. The contamination of these products can mainly occur due inefficient thermal processing or the lack of practices of hygiene and cleaning during the various stages of the production process, like occur during food handling or, even, after the thermal treatment. The rapid identification of pathogens in foods is extremely important, both for the quality assurance of products, such as in cases of outbreaks. Thus, the use of highly sensible and specific methods to detect food pathogens becomes indispensable. One of the techniques has been used to this is the Real Time PCR (qPCR), due its quickness and efficiency to identify pathogens in foods. Nevertheless, one of the major disadvantages of this technique is its inability to differentiate the DNA of viable and nonviable cells of microorganisms. To overcome this drawback, the ethidium bromide monoazide (EMA) can be used to detect viable cells only. EMA is a DNA intercalating dye that can enter selectively in cells with damaged membrane (considered dead) and bind covalently to DNA when exposed to halogen light, inhibiting its amplification during qPCR. So, the aim of this work was establish a protocol to detect in *multiplex* viable cells of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in pure cultures and Coalho cheese by use of EMA combined to Real-time PCR technique. The protocol established is efficient to identify viable cells of *Salmonella* spp., both in pure culture as for Coalho cheese. However, was observed that the differentiation between viable and nonviable cells of *S. aureus* by use of EMA is not efficient. Therefore, is not possible to detect viable cells of these pathogens in *multiplex* in pure cultures and in Coalho cheese. Moreover, it was observed that the established protocol, combining the qPCR technique and EMA, was able to detect viable cells concentrations of *Salmonella typhimurium* as low as 10^1 CFU/10g of Coalho cheese. However, it could only statistically differentiate the means of Cycle threshold (C_t) values in cells concentrations above to 10^3 UFC/10 g of cheese. The developed protocol is, therefore, an useful tool for food surveillance, since it provides rapid and specific identification of viable cells of *Salmonella* spp. in Coalho cheese.

Keywords: Foodborne illness. Milk products. Pathogenic microorganisms. Cell viability. DNA intercalating.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos testados para a fotoativação do EMA.	44
Tabela 2. Sequência dos primers e sondas utilizados.	47
Tabela 3. Componentes utilizados em uma reação multiplex de qPCR com volume final de 25 μ L.....	47
Tabela 4. Componentes utilizados em uma reação monoplex de qPCR.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Série histórica de surtos e casos de DTA no Brasil de 2000 a 2015	23
Figura 2. Proporção dos alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2015	23
Figura 3. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2015.	26
Figura 4. Representação da membrana citoplasmática das bactérias e da parede celular de um micro-organismo Gram-positivo	27
Figura 5. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.	29
Figura 6. Protocolo de cultivo tradicional para isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de alimentos.	32
Figura 7. Representação da incorporação do SYBR® Green à dupla fita de DNA ...	34
Figura 8. Representação do sinal de fluorescência emitido por uma sonda TaqMan™.	35
Figura 9. Ação do EMA sobre células inviáveis.....	37
Figura 10. Esquema da transformação do EMA pela fotoativação	37
Figura 11. Preparo das suspensões de células viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 12. Inoculação das suspensões de células viáveis e inviáveis em amostras de Queijo de Coalho.....	44
Figura 13. Tratamento das amostras com intercalante e fotoativação do EMA.....	45
Figura 14. Inoculação das suspensões de células viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> em amostras de Queijo de Coalho.....	49
Figura 15. Esquema de formação das alíquotas para tratamento com EMA	50
Figura 16. Esquema do delineamento estatístico em parcelas subdivididas realizado para experimentações em culturas puras, Queijo de Coalho inoculado e determinação da melhor concentração de EMA a ser utilizada em amostras de Queijo de Coalho inoculado	52
Figura 17. Esquema do delineamento estatístico em parcelas subdivididas para determinação do limite de detecção da técnica.....	52

Figura 18. Valores médios de C_t obtidos com os diferentes protocolos de fotoativação do EMA.....	54
Figura 19. Valores médios de C_t obtidos com as diferentes concentrações de EMA testadas.....	56
Figura 20. Valores médios de C_t de amostras viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , tratadas e não tratadas com EMA.....	57
Figura 21. Valores de EMASR calculados para amostras viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figura 22. Valores médios de C_t de amostras viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em Queijo de Coalho inoculado, tratadas e não tratadas com EMA.....	59
Figura 23. Valores de EMASR calculados para amostras viáveis e inviáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> inoculadas em amostras de Queijo de Coalho.....	60
Figura 24. Diferenças médias relativas para as diferentes concentrações de EMA testadas em amostras de Queijo de Coalho inoculadas com <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figura 25. Valores médios de C_t das amostras tratadas e não tratadas com EMA (0 e 50 $\mu\text{g/mL}$) dentro de cada uma das concentrações de células viáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> testadas	62
Figura 26. Valores médios de C_t obtidos na determinação do limite de detecção em amostras de Queijo de Coalho inoculadas com diferentes concentrações de células viáveis de <i>Salmonella typhimurium</i> , tratadas ou não com EMA (50 $\mu\text{g/mL}$).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

AUR - *Staphylococcus aureus*

BAM - *Bacteriological Analytical Manual* (Manual Analítico Bacteriológico)

BHI - *Brain Heart Infusion* (Infusão Cérebro e Coração)

BP - ágar Baird-Parker

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para Controle e Prevenção de Doenças)

cm - centímetro

C_t - *Cycle Threshold* (ciclo limiar)

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos)

EMA - *Ethidium Monoazide Bromide* (brometo de etídeo monoazida)

EMASR - *Ethidium Monoazide Bromide Sinal Reduction* (Sinal de Redução do EMA)

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Epamig - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

EUA - Estados Unidos da América

FRET - *fluorescence resonance energy transfer* (transferência de energia de ressonância de fluorescência)

g - grama

h - hora

HCl - Ácido Clorídrico

IAL - Instituto Adolfo Lutz

ILCT - Instituto de Laticínios Cândido Tostes

IN - Instrução Normativa

LED - *light emitter diode* (diodo emissor de luz)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar

M - molar

nm - nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PMA - *Propidium Monoazide* (Propídeo Monoazida)

pH - potencial Hidrogeniônico

qPCR - *Real Time Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rpm - rotações por minuto

SAL - *Salmonella* spp.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

spp. - *Species pluralis* (abreviação para “múltiplas espécies” em Latim)

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

UFC - unidades formadoras de colônias

W - watts

μg - micrograma

μL - microlitro

x g - força centrífuga

SUMÁRIO

1	Introdução.....	18
2	Objetivos.....	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	Revisão de Literatura.....	22
3.1	Doenças Transmitidas por Alimentos.....	22
3.2	Queijo de Coalho	24
3.3	Patógenos Envolvidos em Surtos	26
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.3.2	<i>Salmonella</i> spp.	29
3.4	Detecção de Patógenos em Alimentos	31
3.4.1	Métodos Tradicionais.....	31
3.4.2	Métodos Moleculares.....	33
3.5	Agentes Intercalantes de DNA.....	36
4	Material e Métodos	42
4.1	Obtenção das culturas puras	42
4.2	Tratamento térmico	43
4.3	Inoculação dos patógenos em amostras de Queijo de Coalho	43
4.4	Tratamento com Brometo de Etídeo Monoazida.....	44
4.5	Extração de DNA	45
4.5.1	Culturas Puras.....	45
4.5.2	Amostras de Queijo Coalho Inoculado	46
4.6	PCR em Tempo Real	47
4.7	Cálculo do Sinal de Redução do EMA (EMASR)	48
4.8	Limite de Detecção.....	49
4.9	Análises Estatísticas	51
5	Resultados e Discussão	54
5.1	Culturas Puras	54
5.2	Validação da Metodologia em Amostras de Queijo de Coalho	58
5.3	Limite de Detecção.....	62
6	Conclusões	65
7	Referências.....	66

1 INTRODUÇÃO

Devido as suas características composicionais, os alimentos são excelentes substratos para o desenvolvimento de diversos micro-organismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Tais doenças ocorrem em todo o mundo (FUSCO & QUERO, 2014) e causam grandes perdas econômicas, como diminuição da qualidade de vida dos trabalhadores, perda de produtividade e elevados custos com saúde (KADARIYA *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada 10 pessoas adoece no mundo por ano devido à ocorrência de DTA (WHO, 2015).

Dentre os alimentos potencialmente causadores de DTA, os lácteos têm papel de destaque. Segundo o Ministério da Saúde o leite e seus derivados foram relacionados a 3,4% dos surtos de DTA ocorridos no Brasil de 2000 a 2015, sendo que em 51% dos surtos não foi possível identificar fonte de infecção alimentar.

Para evitar a ocorrência de novos casos de DTA envolvendo produtos lácteos, é fundamental a utilização de matéria prima (leite cru) segura e de qualidade, sendo a pasteurização uma das formas mais indicadas para eliminação de patógenos no leite cru (FUSCO & QUERO, 2014). A Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomenda o uso de leite pasteurizado para a fabricação de derivados lácteos, incluindo o Queijo de Coalho, um dos tipos de queijo mais consumidos no nordeste brasileiro (DIAS *et al.*, 2015).

Apesar de sua popularidade, o Queijo de Coalho muitas vezes está associado a uma imagem de alimento não seguro (ALMEIDA *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2015). À essa imagem, estão relacionados problemas de utilização de matérias primas não seguras, falta de higiene durante o processamento e armazenamento do produto, além de problemas relacionados ao transporte (ALMEIDA *et al.*, 2013). Em todas as situações citadas, o produto pode sofrer contaminação por micro-organismos patogênicos, tornando-se, portanto, um risco à saúde do consumidor.

Muitos estudos têm relatado a presença de patógenos em Queijo de Coalho (BORGES *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2005;

EVÊNCIO-LUZ *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014), sendo *Staphylococcus* positivos no teste da coagulase e *Salmonella* spp. os micro-organismos mais comumente relatados. De acordo com o Ministério da Saúde, esses são os patógenos mais frequentemente associados a surtos de origem alimentar, sendo responsáveis por 22,1% dos surtos de DTA ocorridos no Brasil de 2000 a 2015 (BRASIL, 2015). Nesses casos, a identificação rápida e específica do agente patogênico é de fundamental importância, tanto para a vigilância de alimentos quanto para o tratamento adequado dos doentes.

Várias metodologias podem ser utilizadas na identificação de micro-organismos, dentre as quais estão a técnica de microbiologia clássica e as técnicas moleculares. Os métodos considerados “padrão ouro” para a detecção desses patógenos em alimentos são aqueles baseados em cultivo. Geralmente, constituem-se em etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, plaqueamentos seletivos e diferenciais e confirmação por testes bioquímicos (DWIVEDI *et al.*, 2011; ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Apesar de serem técnicas sensíveis, com custo relativamente baixo e de fácil padronização, são bastante laboriosas e demandam tempo considerável para se chegar a um diagnóstico definitivo (DWIVEDI *et al.*, 2011; ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Em alguns casos, pode ser necessário mais de uma semana de testes até se obter a confirmação do patógeno (ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Além disso, a quantificação dos micro-organismos pode ser superestimada devido às etapas iniciais de enriquecimento (ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Assim, o uso de metodologias mais acuradas e rápidas faz-se necessário, principalmente frente a um surto de origem alimentar em que a identificação rápida do patógeno causador é determinante.

Dessa forma, as técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), constituem-se em alternativas mais sensíveis, específicas e rápidas em relação aos métodos tradicionais. Deve-se considerar, ainda, a possibilidade de detecção de mais de um patógeno em uma mesma reação, realizando as chamadas reações em *multiplex*, onde mais de um alvo pode ser detectado. Contudo, apesar de todas essas vantagens, a qPCR não é capaz de diferenciar células viáveis e inviáveis de micro-organismos patogênicos, o que é imprescindível em amostras de alimentos, uma vez que somente patógenos viáveis podem causar agravos à saúde dos consumidores. Para tanto, moléculas

intercalantes de DNA, como o Brometo de Etídeo Monoazida (EMA) ou o Propídeo Monoazida (PMA), podem ser usadas juntamente à qPCR para suplantar essa desvantagem (NOVGA *et al.*, 2003).

O EMA é uma molécula capaz de penetrar seletivamente em células com membrana danificada e se ligar covalentemente ao DNA das mesmas após exposição à luz halógena visível, não permitindo, portanto, que ocorra sua amplificação durante a qPCR (NOVGA *et al.*, 2003). Logo, células com membranas intactas não sofrem ação do intercalante, uma vez que essas membranas constituem-se em barreiras físicas à entrada do mesmo (RUDI *et al.*, 2005a). Deste modo, a distinção entre células viáveis e inviáveis pelo uso do EMA é determinada pela integridade da membrana celular.

A utilização do EMA combinado à técnica de qPCR permite, portanto, a detecção de patógenos viáveis em alimentos de maneira mais rápida e sensível do que os métodos tradicionais usados. Sendo assim, essa metodologia constitui-se em uma importante ferramenta tanto para a vigilância de alimentos quanto para o diagnóstico de DTA's, principalmente em casos de surtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de detecção de células viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em Queijo de Coalho utilizando EMA combinado à técnica de qPCR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo para detecção em *multiplex* de células viáveis de *S. aureus* e *Salmonella* spp. em culturas puras pela técnica de qPCR combinada ao uso de EMA.

- Validar o protocolo estabelecido em culturas puras para detecção células viáveis de *S. aureus* e *Salmonella* spp. em amostras de Queijo de Coalho inoculado utilizando qPCR combinada ao uso do EMA.

- Estabelecer o limite de detecção da técnica em amostras de Queijo de Coalho inoculado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Devido as suas características composicionais, os alimentos são excelentes substratos para o crescimento de diversos micro-organismos. Portanto, podem ser considerados importantes veículos para transmissão de doenças, com sintomas que variam desde diarreias brandas até síndromes fatais (DWIVEDI *et al.*, 2011). Em todo o mundo há relatos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (FUSCO & QUERO, 2014), que podem ser causadas por uma grande variedade de patógenos, inclusive bactérias (DWIVEDI *et al.*, 2011), as quais causam grandes perdas econômicas, como aumento dos gastos com saúde, perda de produtividade e diminuição da qualidade de vida dos trabalhadores acometidos (KADARIYA *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada 10 pessoas em todo o mundo adoece por ano devido à ocorrência de DTA (WHO, 2015). Em 2014, foram notificados mais de 343 mil casos de DTA na Europa, com 329 mortes (EFSA, 2015). Já nos Estados Unidos da América, 13.287 casos foram relatados nesse mesmo ano, resultando em 20 mortes (CDC, 2015). No Brasil, foram notificados 886 surtos de origem alimentar em 2014, envolvendo 15.700 doentes e resultando em nove mortes. Somente em 2015, foram relatados no Brasil 426 surtos, com 7.371 doentes e quatro mortes (Figura 1) (BRASIL, 2015).

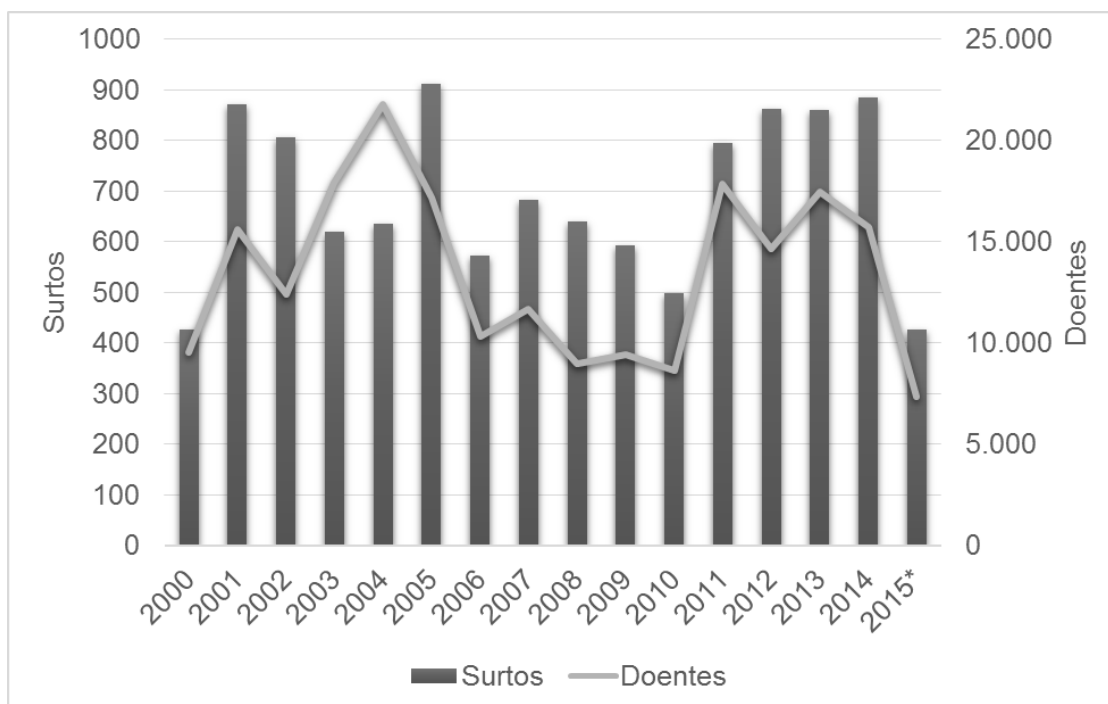


Figura 1. Série histórica de surtos e casos de DTA no Brasil de 2000 a 2015*. Dados sujeitos a alteração. *Última atualização em Outubro de 2015.

FONTE: Adaptado de SINAN/SVS/Ministério da Saúde

Dentre os alimentos potencialmente causadores de DTA, os lácteos têm papel de destaque. De acordo com o Ministério da Saúde, o leite e seus derivados foram relacionados a 3,4% dos surtos de DTA ocorridos no Brasil de 2000 a 2015 (Figura 2) (BRASIL, 2015).

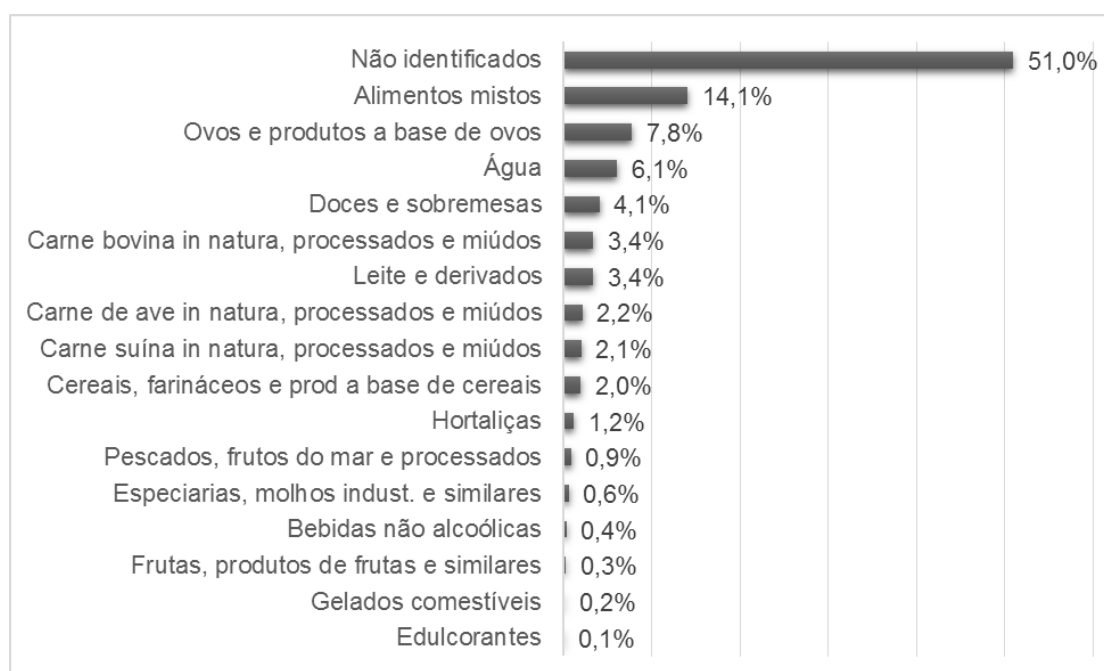


Figura 2. Proporção dos alimentos incriminados em surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2015. Dados sujeitos a alteração. Última atualização em Outubro de 2015.

FONTE: Adaptado de SINAN/SVS/Ministério da Saúde

Apesar de ser considerado estéril na glândula mamária de animais sadios (FUSCO & QUERO, 2014), o leite pode sofrer contaminação por micro-organismos patogênicos a partir do momento da ordenha. Dessa forma, recomenda-se o tratamento térmico, como a pasteurização, para a eliminação desses patógenos presentes no leite, garantindo, assim, uma matéria prima segura e de qualidade. Entretanto, caso práticas de higiene não sejam adotadas durante todas as etapas de produção e processamento do leite e seus derivados, os mesmos podem sofrer contaminação cruzada após o tratamento térmico, resultando em produtos finais que podem afetar a saúde do consumidor (FUSCO & QUERO, 2014).

A ocorrência de DTA envolvendo produtos lácteos pasteurizados pode advir de dois principais motivos: i) ineficiência da pasteurização, em que o binômio tempo-temperatura não é realizado de maneira adequada, não sendo, portanto, capaz de eliminar totalmente os patógenos presentes no leite cru; ii) ocorrência de contaminação cruzada em ambientes pós-processamento ou durante a preparação dos alimentos (D'AMICO & DONNELLY 2008; FOX *et al.*, 2009 *apud* FUSCO & QUERO, 2014).

Portanto, é imprescindível a adoção de técnicas de produção que visem à garantia da qualidade dos produtos lácteos, de forma a evitar a contaminação cruzada dos mesmos por micro-organismos patogênicos. Assim, garante-se que barreiras não tarifárias, como a segurança microbiológica de alimentos, não se constituam em entraves à exportação de produtos lácteos, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de leite (FAO, 2013). Ressalta-se, ainda, a importância de desenvolver e/ou aperfeiçoar metodologias que sejam cada vez mais rápidas, sensíveis e específicas para identificar a presença de possíveis patógenos nesses alimentos, fornecendo, dessa forma, subsídios para tomada de decisão em casos de contaminação de alimentos.

3.2 QUEIJO DE COALHO

O Queijo de Coalho é um dos derivados lácteos mais consumidos no nordeste brasileiro, representando grande importância econômica na região (DIAS *et al.*, 2015),

sendo, em muitos casos, a principal fonte de renda da população em determinadas localidades (ALMEIDA *et al.*, 2010 *apud* SILVA *et al.*, 2012).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 30, de 26 de junho de 2001 do MAPA, o Queijo de Coalho deve ser obtido a partir da coagulação do leite pelo coalho ou outras enzimas coagulantes próprias, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas específicas. É um queijo de média a alta umidade, de massa cozida ou semicozida, com teor de sólidos totais variando entre 35% e 60% (BRASIL, 2001). A legislação recomenda o uso de leite pasteurizado para a fabricação do Queijo de Coalho (BRASIL, 2001). Entretanto, são encontrados no mercado muitos produtos feitos de maneira artesanal, que utilizam leite cru como matéria prima (ALMEIDA *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012). Por isso, muitas vezes o Queijo de Coalho está associado a uma imagem de alimento não seguro (ALMEIDA *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2015). A essa imagem, estão relacionados, ainda, falta de higiene durante o processamento e armazenamento do produto, problemas relacionados ao transporte do mesmo, além da utilização de matérias primas não seguras (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm relatado a presença de patógenos em Queijo de Coalho, como *Staphylococcus* positivos no teste da coagulase (BORGES *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2008; EVÊNCIO-LUZ *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2014), *Salmonella* spp (BORGES *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2005; EVÊNCIO-LUZ *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2014) e coliformes totais e termotolerantes (BORGES *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014). Portanto, mesmo que as recomendações da IN 30/2001 sejam acatadas e que o Queijo de Coalho seja produzido de acordo com os requisitos mínimos de identidade e qualidade estabelecidos, problemas relacionados à conservação e manipulação do produto após processamento térmico podem ocorrer. Por isso deve ser realizada uma vigilância severa sobre esse produto, com o objetivo de garantir sua qualidade e inocuidade.

Dessa forma, para que a comercialização do Queijo de Coalho possa ser realizada em até 10 dias após a sua fabricação, como estabelecido pela IN 30/2001, o uso de técnicas rápidas, sensíveis e específicas para detecção de possíveis patógenos nesse produto torna-se imprescindível, de forma a evitar prejuízos

financeiros causados pelo atraso no fornecimento de produtos comprovadamente seguros ao mercado.

3.3 PATÓGENOS ENVOLVIDOS EM SURTOS

Dentre os principais patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar no Brasil de 2000 a 2015, *Salmonella* spp. e *S. aureus* são os mais recorrentes (Figura 3). Por isso, é fundamental o melhor conhecimento desses micro-organismos, além de ser imprescindível o desenvolvimento de técnicas cada vez mais eficazes para a detecção dos mesmos.

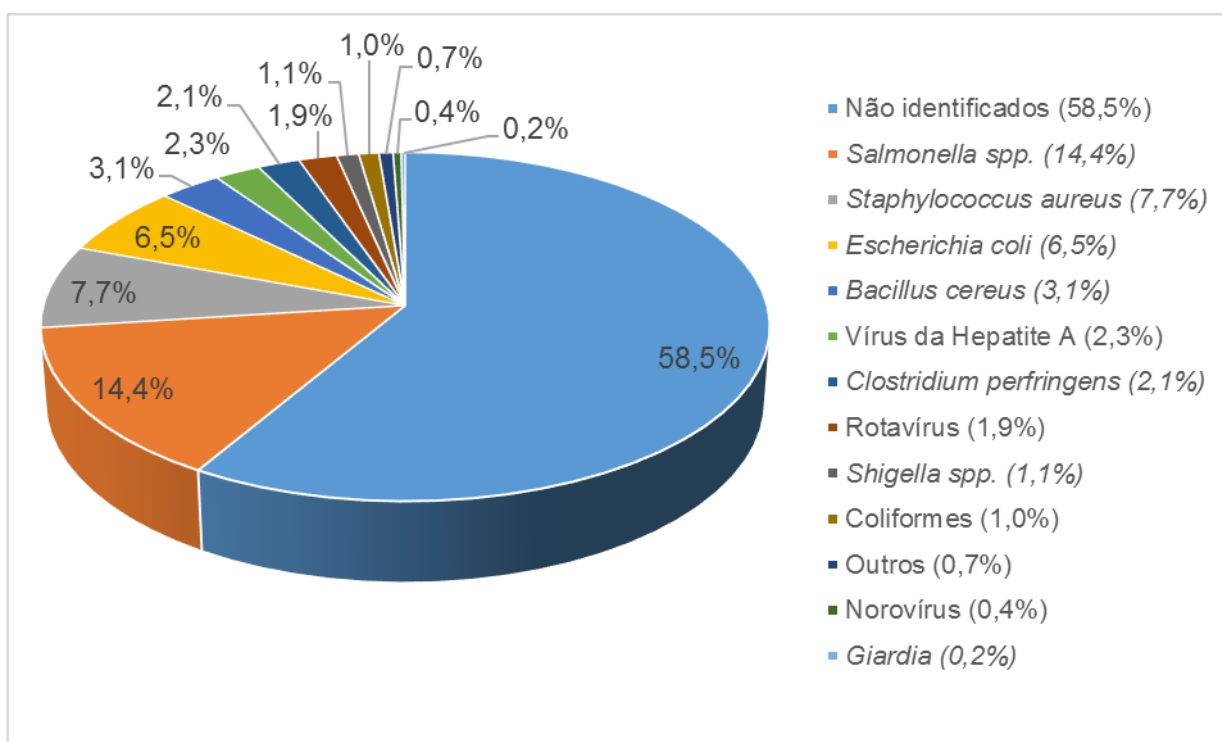


Figura 3. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2015. Dados sujeitos a alteração. Última atualização em Outubro de 2015. FONTE: Adaptado de SINAN/SVS/Ministério da Saúde

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos. É capaz de crescer em condições não ótimas, como em amplas faixas de temperaturas (7° a 48,5°C) e pH (4,2 a 9,3). Tolerância altas concentrações de NaCl

(até 15%) e atividade de água (a_w) reduzida, o que favorece seu desenvolvimento em determinadas matrizes alimentares (ADAMS, 2008; KADARIYA *et al.*, 2014).

Para que esse micro-organismo seja considerado viável, é necessário que sua membrana citoplasmática permaneça intacta, uma vez que ela é a responsável por controlar a entrada e a saída de substâncias da célula. Se a membrana celular for rompida, a integridade da célula é destruída, o citoplasma extravasa para o ambiente e a célula morre (MADIGAN *et al.*, 2012). A membrana citoplasmática é composta por uma bicamada fosfolipídica. Os fosfolipídeos são compostos por ácidos graxos - componentes hidrofóbicos, voltados para a parte interna da membrana - e glicerofosfato - componentes hidrofílicos, voltados para os meios intra e extracelular (Figura 4 A) (MADIGAN *et al.*, 2012). Além da membrana celular, *S. aureus* possuem parede celular composta de uma espessa camada de peptidoglicanos, uma estrutura externa responsável por conferir forma e rigidez, além de proteger a célula contra lise osmótica (Figura 4 B) (MADIGAN *et al.*, 2012).

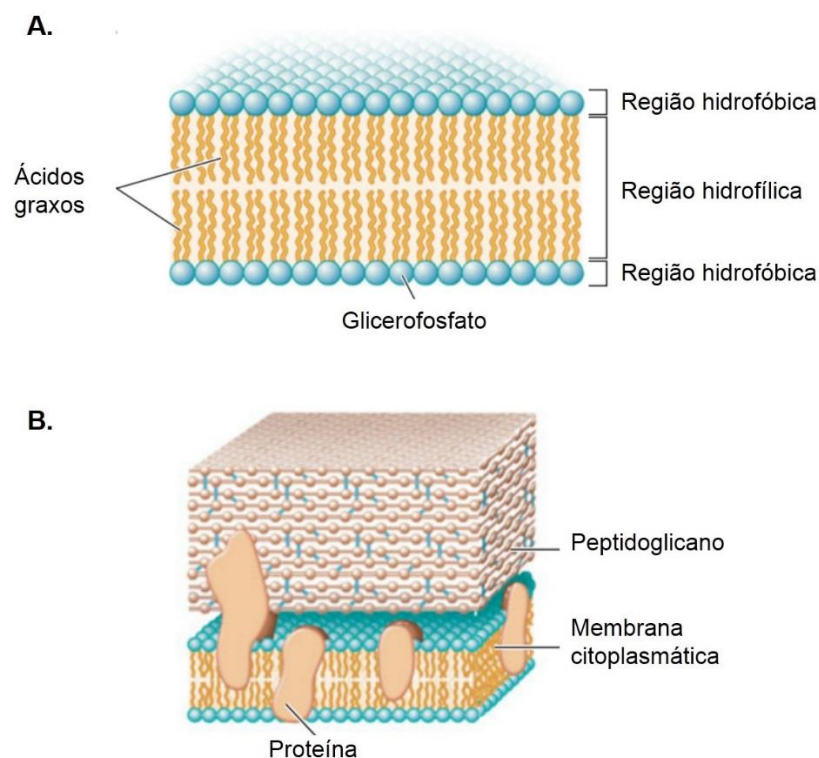


Figura 4. Representação da membrana citoplasmática das bactérias (A) e da parede celular de um micro-organismo Gram-positivo (B).

FONTE: Adaptado de Madigan *et al.*, 2012.

Diferentes tipos de alimentos podem servir como meios favoráveis ao crescimento de *S. aureus* como leite, creme de leite, manteiga, presunto, queijos,

salsichas, saladas e carnes enlatadas (LOIR *et al.*, 2003). Geralmente, as fontes de contaminação dos alimentos são os próprios manipuladores (por contato direto) ou por via respiratória, por espirros ou tosse, uma vez que esse micro-organismo pode ser encontrado na pele, narinas ou pelos de animais de sangue quente (LOIR *et al.*, 2003). Apesar de ser mais raro, o leite de animais com mastite também pode ser uma fonte de contaminação do leite cru (HENNEKINNE *et al.*, 2011). Contudo, a contaminação de alimentos por *S. aureus* frequentemente ocorre após tratamento térmico (LOIR *et al.*, 2003), o que demanda a adoção de medidas de higiene após esse processamento a fim de evitar a ocorrência de DTA.

Uma DTA típica causada por *S. aureus* tem curto período de incubação, já que ocorre devido à ingestão de toxinas termorresistentes previamente produzidas pelo patógeno no alimento (ADAMS, 2008). As pessoas acometidas por intoxicação estafilocócica geralmente apresentam os primeiros sintomas de 2 a 4 h após a ingestão do alimento contaminado (ADAMS, 2008). A rapidez com que os sintomas surgem depende da quantidade de toxina ingerida pelo paciente, mas geralmente pequenas doses são capazes de desencadear a doença (KADARIYA *et al.*, 2014). Náuseas, salivação excessiva, vômitos e dores abdominais com ou sem diarreia são os sintomas mais comumente apresentados (KADARIYA *et al.*, 2014). Geralmente as intoxicações estafilocócicas são autolimitantes e os sintomas desaparecem dentro de 24 a 48 h. Porém, podem ser extremamente severas em crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos.

Para que um alimento seja responsável por causar DTA devido intoxicação estafilocócica, são necessárias cinco condições básicas: (1) uma fonte contendo uma linhagem de *S. aureus* produtora de enterotoxina (como alimentos crus ou manipuladores infectados), (2) transferência do patógeno ao alimento devido a práticas de higiene e/ou manejo inadequadas, (3) composição físico-química do alimento favorável ao crescimento de *S. aureus*, (4) temperatura favorável e tempo suficiente para o crescimento do patógeno e produção da toxina, e (5) ingestão do alimento contendo quantidades suficientes da toxina para provocar os sintomas (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

Para evitar a ocorrência de DTA por *S. aureus* é preciso impedir que os alimentos sejam contaminados por esse patógeno, evitando, assim, que ocorra a

produção de toxinas. Dessa forma, a adoção de práticas de higiene durante todas as etapas do processo produtivo se torna imprescindível.

3.3.2 *Salmonella* spp.

Pertencentes à família Enterobacteriaceae, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e que podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (7 a 48°C) (ADAMS, 2008). São micro-organismos sensíveis ao calor, portanto a pasteurização e tratamentos térmicos semelhantes são capazes de eliminá-los dos alimentos (FERNANDES, 2009). Diferentemente de *S. aureus*, *Salmonella* spp. não toleram altas concentrações de NaCl e são relativamente resistentes a ambientes e substratos secos (FERNANDES, 2009).

Assim como *S. aureus*, as salmonelas têm sua viabilidade determinada pela integridade da membrana celular (Figura 4 A). Entretanto, possuem a estrutura de sua parede celular mais complexa, composta de uma camada mais fina de peptidoglicanos e da membrana externa, composta de lipopolissacarídeos (Figura 5) (MADIGAN *et al.*, 2012).

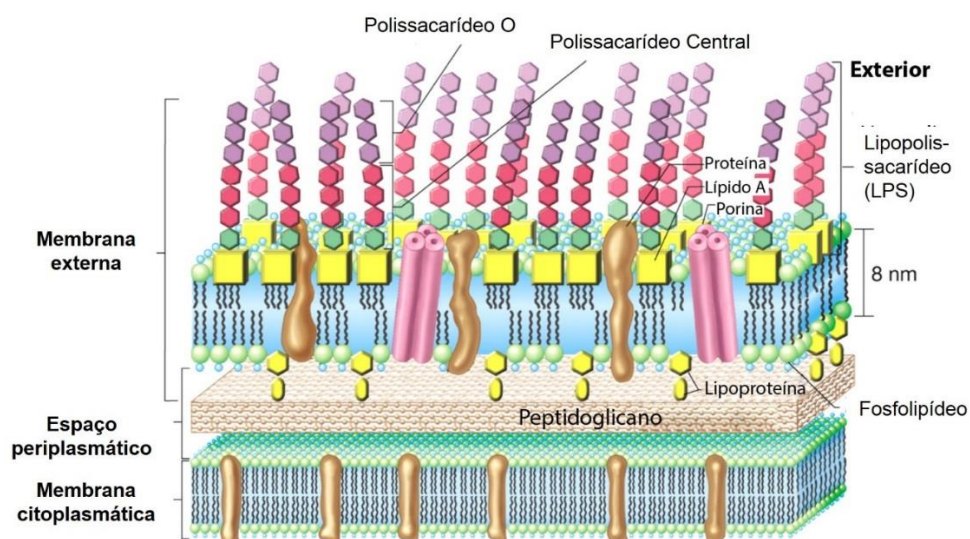


Figura 5. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.
FONTE: Adaptado de Madigan *et al.*, 2012.

Salmonella spp. pode ser encontrada no intestino de animais domésticos e selvagens, resultando em uma grande variedade de fontes de infecção (ALLERBERGER *et al.*, 2002 *apud* CARRASCO *et al.*, 2012). Esse patógeno está amplamente difundido no ambiente e pode ocorrer em uma grande variedade de alimentos, representando um grave problema para a indústria alimentícia (EL-GAZZAR & MARTH, 1992).

Em geral, carne, frango e ovos são veículos constantes de *Salmonella* spp. envolvidos em surtos de DTA. Contudo, outros alimentos como leite e derivados, frutas, vegetais e pescados também podem ser fontes de infecção desse patógeno (CARRASCO *et al.*, 2012). Geralmente, contaminação fecal durante a ordenha é a rota primária de transmissão de *Salmonella* spp. para o leite cru. Dessa forma, a utilização de leite não pasteurizado para a fabricação de queijos se constitui em um grande risco à saúde humana.

Além disso, pelo fato de *Salmonella* spp. poder permanecer viável em superfícies de contato por mais de 100 dias (IIBUCHI *et al.*, 2010), o risco de eventos de contaminação cruzada é alto. Essa contaminação pode ser originada na salmoura, no chão do ambiente produtivo, no material de embalagem, em utensílios utilizados na fabricação dos queijos, na câmara fria e no ar da sala de produção (CARRASCO *et al.*, 2012). Ainda, a contaminação desses produtos e utensílios na indústria pode ocorrer, também, por insetos, pássaros, roedores, animais de companhia, água e gelo (EL-GAZZAR & MARTH, 1992). Dessa forma, a limpeza e higienização desses ambientes, superfícies e utensílios deve ser constantemente realizada a fim de se evitar a contaminação dos alimentos e consequente ingestão desse patógeno pelos consumidores (CARRASCO *et al.*, 2012).

Uma vez que o micro-organismo viável é ingerido, ocorre seu crescimento no intestino delgado, seguido de inflamação, podendo resultar em enterocolite (EL-GAZZAR & MARTH, 1992). Em geral, os sintomas surgem de 12 a 36 h após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas e sinais clínicos mais comuns são diarreia, dor abdominal, febre, vômitos, prostração e anorexia, podendo haver também casos de septicemia. A salmonelose pode causar quadros mais graves em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, podendo, inclusive, levar à morte (SILVA, 2007).

Como já mencionado, tanto para *Salmonella* spp. quanto para *S. aureus* é de extrema importância a adoção de práticas de higiene durante todas as etapas do processo produtivo, a fim de se evitar a contaminação dos alimentos por esses patógenos. Além disso, ressalta-se a necessidade de utilização de metodologias cada vez mais rápidas, sensíveis e específicas para a detecção desses micro-organismos nos alimentos, garantindo, assim, a qualidade microbiológica dos produtos finais.

3.4 DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM ALIMENTOS

3.4.1 Métodos Tradicionais

Os métodos tradicionais ou baseados em cultivo, considerados “padrão ouro”, têm sido usados para monitoramento da qualidade de alimentos. Essas técnicas são baseadas nos métodos de microbiologia clássica descritos no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) e, geralmente, constituem-se em etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, plaqueamentos seletivos e diferenciais e confirmação (DWIVEDI *et al.*, 2011; ELIZAGUIVEL *et al.*, 2013).

O pré-enriquecimento é realizado tanto para a recuperação de células injuriadas, quanto para aumentar a quantidade do patógeno alvo presente na amostra. Além disso, funciona como um meio de hidratação de micro-organismos presentes em alimentos secos ou processados. No enriquecimento seletivo são usados meios de cultura específicos para o patógeno que se deseja identificar, de forma que tenha seu crescimento beneficiado em detrimento de outros micro-organismos indesejáveis presentes na amostra (DWIVEDI *et al.*, 2011).

Após a etapa de enriquecimento, são realizados os plaqueamentos seletivos e diferenciais, com o objetivo de isolar colônias da espécie alvo pelo uso de meios e agentes seletivos que facilitem o crescimento do alvo e inibam o crescimento de outros micro-organismos presentes na amostra por competição (DWIVEDI *et al.*, 2011). Nessa etapa, espera-se a obtenção de colônias típicas se o alvo estiver presente na amostra. Caso contrário, a amostra é considerada negativa para o patógeno pesquisado (DWIVEDI *et al.*, 2011). Quando colônias presumivelmente positivas (não confirmadas) são obtidas, a confirmação pode ser realizada por testes bioquímicos. Além disso, outros testes como antibiograma e tipagem molecular podem ser

realizados a fim de se obter mais informações sobre o alvo pesquisado (DWIVEDI *et al.*, 2011).

O isolamento de *S. aureus* é realizado em ágar Baird-Parker (BP), que é o meio recomendado para isolamento e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positivos (ADAMS, 2008). Após a inoculação da amostra no meio, as placas devem ser incubadas a 35°C por 24 a 48 h (ADAMS, 2008). As colônias de *S. aureus* possuem crescimento bom e abundante nesse meio de cultura e apresentam coloração cinza escuro de aspecto brilhante (ADAMS, 2008). Após o crescimento das colônias, são necessários testes adicionais para a produção de coagulase e nucleases termoestáveis para a confirmação do patógeno (ADAMS, 2008). O isolamento e identificação de *Salmonella* spp. envolve mais etapas para a confirmação do patógeno quando comparado aos procedimentos para confirmação de *S. aureus*, sendo necessária a realização do pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e confirmação por testes bioquímicos e sorológicos (Figura 6) (ADAMS, 2008).

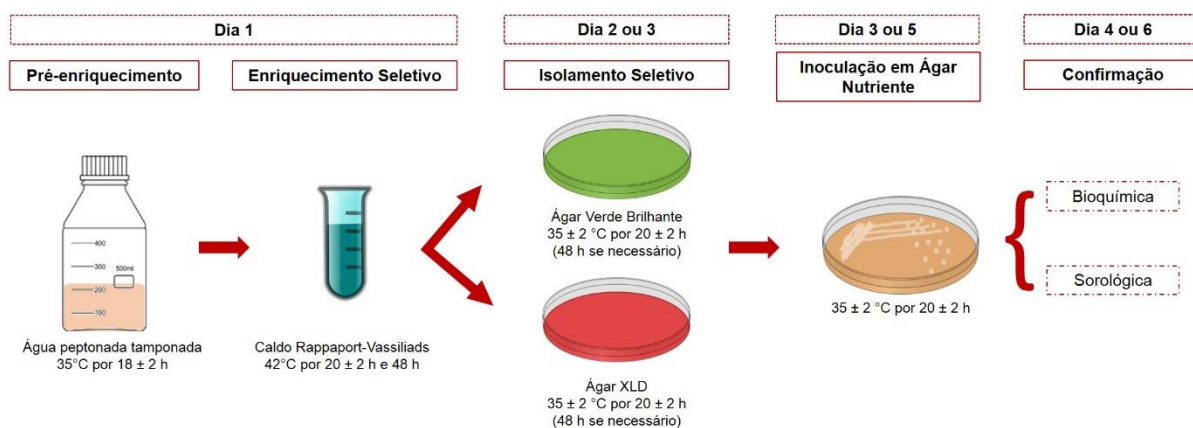


Figura 6. Protocolo de cultivo tradicional para isolamento de *Salmonella* spp. de amostras de alimentos.

FONTE: Adaptado de ADAMS (2008).

Apesar das técnicas de microbiologia clássica serem relativamente baratas, sensíveis, de fácil padronização, além de permitir a distinção entre células viáveis e inviáveis de patógenos presentes em amostras de alimentos (DWIVEDI *et al.*, 2011), são também bastante laboriosas e demandam tempo considerável para se chegar a confirmação do agente patogênico (DWIVEDI *et al.*, 2011; ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Em alguns casos, pode ser necessário mais de uma semana de testes até se obter a confirmação dos resultados (ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013). Além disso, a quantificação

dos micro-organismos pode ser superestimada devido às etapas iniciais de enriquecimento (ELIZAQUÍVEL *et al.*, 2013).

Dessa forma, o uso de metodologias mais acuradas e rápidas faz-se necessário, principalmente frente a um surto de origem alimentar em que a identificação rápida do patógeno causador é fatalmente determinante.

3.4.2 Métodos Moleculares

Técnicas baseadas na amplificação de DNA são alternativas eficazes aos métodos de cultivo, pois são rápidas, altamente sensíveis e específicas para detecção de patógenos em alimentos. Dentre as metodologias moleculares existentes, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) tem sido muito utilizada devido à possibilidade de verificação do resultado em tempo real, fato que elimina etapas posteriores de manipulação das amostras e diminui o tempo demandado para obtenção do resultado definitivo.

A qPCR é a coleta contínua de sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos, na presença dos alvos, durante os ciclos da reação em cadeia da polimerase (DORAK, 2006). Os sinais fluorescentes emitidos em cada reação são convertidos em um valor numérico para cada alvo presente na amostra. Os resultados da qPCR são obtidos em valores de C_t (*Cycle Threshold*) que representam o ciclo no qual a fluorescência emitida em uma reação ultrapassa o limiar de detecção do equipamento ou *Threshold* (DORAK, 2006).

Os principais sistemas de detecção usados em qPCR são baseados em moléculas intercalantes de DNA (*SYBR® Green*) e sondas de hidrólise (*TaqMan™* e *Molecular Beacons*). O *SYBR® Green* é um corante que se intercala de forma inespecífica a moléculas de DNA dupla fita. O sinal de fluorescência emitido por esse intercalante, quando em solução e não ligado ao DNA, é muito baixo (SHIPLEY, 2006). Entretanto, quando se liga à dupla fita de DNA, emite forte sinal de fluorescência, que é captado pelo termociclador de qPCR (Figura 7). O sinal de fluorescência emitido pelo *SYBR® Green* é, portanto, proporcional à quantidade de moléculas dupla-fita a que está ligado. Assim, o sinal captado pelo equipamento tende a aumentar durante a qPCR.

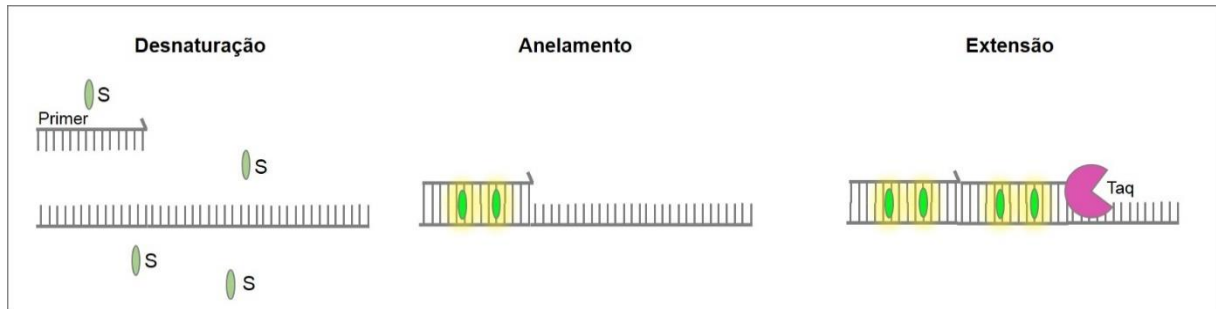


Figura 7. Representação da incorporação do SYBR® Green à dupla fita de DNA. Taq = Taq DNA Polimerase; S = Sybr.

FONTE: Adaptado de Shipley (2006).

Dentre as vantagens que esse tipo de ensaio apresenta, pode-se citar o baixo custo do intercalante, a facilidade de desenvolvimento do ensaio e o fato de poder ser usado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla fita. Entretanto, algumas desvantagens também podem ser enumeradas, dentre elas a ocorrência de falso-positivos e a impossibilidade de realização de *multiplex*, uma vez que o SYBR® Green liga-se de maneira inespecífica a qualquer sequência de DNA dupla fita (SHIPLEY, 2006).

Outra metodologia de detecção bastante utilizada em qPCR é o sistema TaqMan™, que são oligonucleotídeos lineares marcados com fluoróforos (sondas) e desenhados para regiões específicas do alvo (entre as regiões de anelamento dos *primers*). Esse sistema confere, portanto, maior especificidade às reações do que o SYBR® Green (SHIPLEY, 2006). Cada sonda é constituída por um *Reporter* na extremidade 5' e um *Quencher* na extremidade 3'. Quando ligados, a fluorescência emitida pelo *Reporter* é captada pelo *Quencher* por um processo conhecido como *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Durante a qPCR a enzima Taq DNA Polimerase hidrolisa a sonda, liberando o *Reporter* do *Quencher*. Nesse momento, a fluorescência emitida pelo *Reporter* deixa de ser sequestrada pelo *Quencher* e passa a ser captada pelo equipamento de qPCR (Figura 8) (SHIPLEY, 2006).

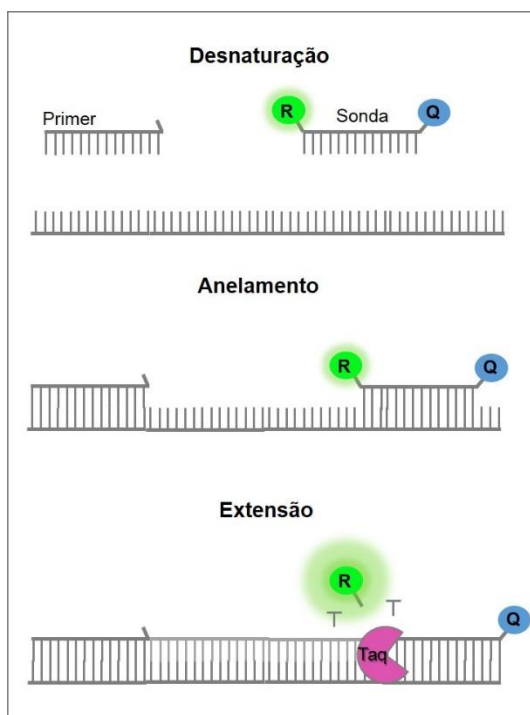


Figura 8. Representação do sinal de fluorescência emitido por uma sonda TaqMan™. R = *Reporter*; Q = *Quencher*; Taq = Taq DNA Polimerase. FONTE: Adaptado de Shipley (2006).

Dentre as vantagens do ensaio TaqMan™, pode-se citar sua alta especificidade, uma vez que é necessário que ocorra a hibridização específica entre a sonda e o alvo pesquisado para que o sinal de fluorescência seja emitido. *Reporters* distintos podem ser usados em sondas para diferentes alvos, permitindo a captação distinta dos sinais de fluorescência emitidos por cada um deles (SHIPLEY, 2006). Devido a essa característica, a realização de *multiplex* torna-se possível. Ainda, a realização de *multiplex* reduz o tempo total da reação, constituindo-se em uma outra vantagem oferecida por esse tipo de ensaio. Entretanto, devido à necessidade de síntese de sondas marcadas, o custo do ensaio é mais elevado quando comparado ao SYBR® Green (SHIPLEY, 2006).

Embora os métodos moleculares possuam grandes vantagens em relação aos métodos tradicionais para detecção de patógenos em alimentos, algumas limitações devem ser consideradas. Dentre elas, destaca-se a incapacidade da técnica em diferenciar micro-organismos viáveis e inviáveis, pelo fato da molécula de DNA permanecer intacta mesmo após a morte do organismo (NOVGA, 2003), gerando, assim, resultados falso-positivos. Assim, o uso de moléculas intecalantes de DNA pode ser uma alternativa promissora na detecção de patógenos viáveis em alimentos,

uma vez que somente patógenos viáveis podem se tornar um risco à saúde dos consumidores.

3.5 AGENTES INTERCALANTES DE DNA

Uma alternativa eficaz para a detecção de células viáveis por qPCR é o uso de moléculas intercalantes de DNA como o Brometo de Etídeo Monoazida (EMA) ou o Propídeo Monoazida (PMA).

O EMA e o PMA são moléculas capazes de penetrar em células com membrana danificada (consideradas inviables) e se ligarem ao DNA das mesmas. Entretanto, esses intercalantes não possuem o mesmo efeito sobre as células com membranas intactas (consideradas viáveis), uma vez que a própria membrana age como uma barreira física à entrada dos corantes (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

A ligação do EMA ou do PMA ao DNA torna-se covalente após exposição à luz halógena visível, o que impede sua amplificação durante a qPCR, já que essa ligação não é desfeita pelo aumento de temperatura ocorrido na reação (Figura 9). Pelo fato das membranas celulares constituírem-se em barreiras físicas à entrada dos corantes, as células com membranas intactas não sofrem ação dos mesmos (RUDI *et al.*, 2005a). Portanto, a distinção entre células viáveis e inviables pelo uso do EMA e do PMA é determinada pela integridade da membrana celular.

A habilidade dessas moléculas em se ligar ao DNA das células também está muito relacionada à sua estrutura química. O EMA possui um grupamento azida (Figura 10 A) que, após fotoativação, é convertido em um radical nitreno altamente reativo (Figura 10 B), capaz de se ligar covalentemente ao DNA e a outras moléculas orgânicas (Figura 10 C). O excesso de intercalante que permanece livre em solução (não ligado ao DNA), reage com moléculas de água após a fotoativação, formando o etídeo hidroxialamino (Figura 10 D). O composto resultante não é reativo, o que impede a ligação do intercalante com o DNA extraído de células com membranas intactas (NOCKER & CAMPER, 2006).

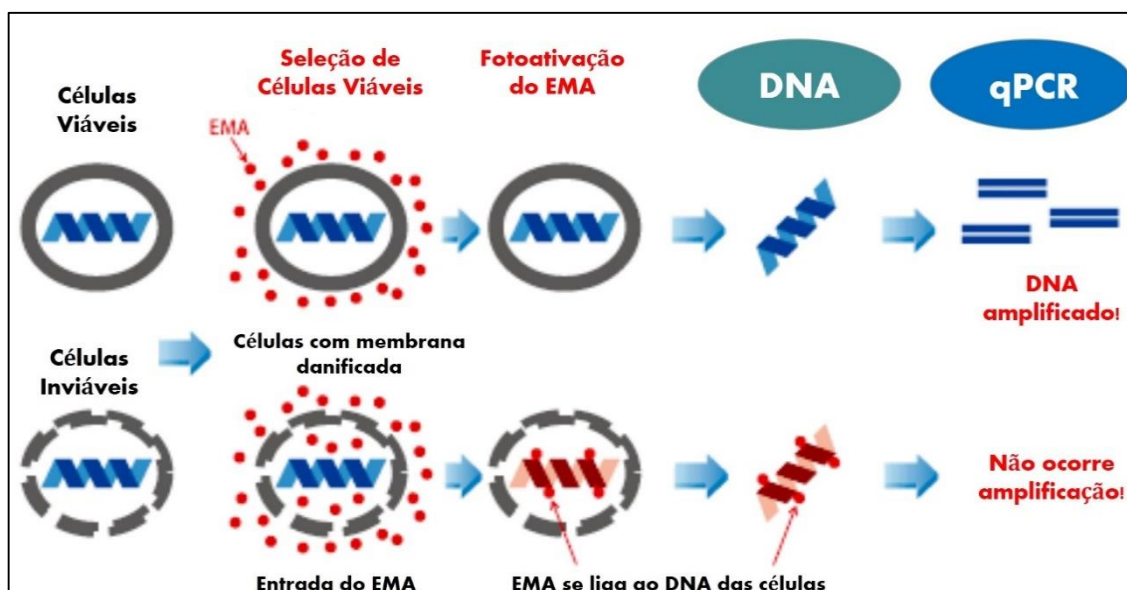


Figura 9. Ação do EMA sobre células inviáveis.

FONTE: adaptado de <http://www.takahara-bio.com.jp/news/2011/08/17.htm>.

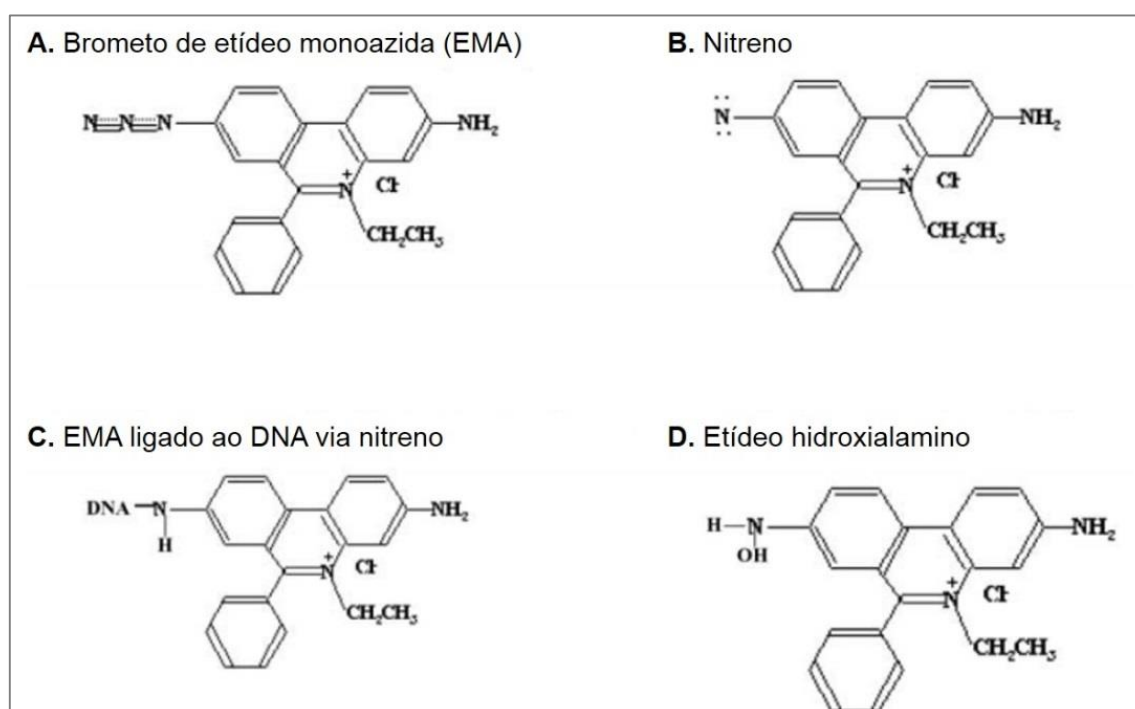


Figura 10. Esquema da transformação do EMA pela fotoativação. A: Brometo de etídeo monoazida (EMA). B: Grupamento azida é convertido em nitreno após exposição à luz visível. C: EMA, após se intercalar ao DNA, se liga covalentemente ao mesmo via nitreno imediatamente após a fotoativação. D: EMA fotoativado livre, não intercalado ao DNA, reage com moléculas de água para formar o etídeo hidroxialamino.

FONTE: Adaptado de SOEJIMA *et al.*, 2007.

Devido às características supracitadas, o uso do EMA combinado à qPCR permite um diagnóstico rápido, sensível e específico de patógenos viáveis, inclusive

em matrizes alimentares. Todavia, algumas limitações quanto ao uso da técnica têm sido observadas, principalmente no que diz respeito à especificidade do EMA em relação a células com membrana comprometida, podendo gerar resultados falso-negativos. Alguns autores têm afirmado que o EMA pode penetrar em células bacterianas intactas e causar a subestimação da população desses micro-organismos (CAWTHORN & WITTHUHN, 2008; FLEKNA *et al.*, 2007; KOBAYHASHI *et al.*, 2009; NOCKER & CAMPER *et al.*, 2006; NOCKER *et al.*, 2006). Por outro lado, a ocorrência de resultados falso-positivos com o uso do PMA é relatada como o principal problema devido a uma supressão incompleta do sinal de amplificação de células inviáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Portanto, apesar de o EMA ser mais eficiente na supressão do sinal de amplificação de células inviáveis do que o PMA, este último é mais efetivo na diferenciação de células viáveis e inviáveis em relação ao EMA (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Por isso, para otimizar a ação do EMA, deve-se minimizar a captação do corante por células intactas. Já para otimizar da ação do PMA, deve-se objetivar a maximização dos sinais de amplificação de células inviáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

A eliminação do EMA por células viáveis pode ocorrer tanto por bomba de efluxo, em que componentes nocivos à célula são expelidos antes que possam alcançar seu alvo (FLEKNA *et al.*, 2007), quanto por um processo passivo através de barreiras de difusão (RUDI *et al.*, 2005a). Dessa forma, a principal estratégia para diminuir a captação do EMA por células viáveis é a utilização de baixas concentrações. Quanto menor a concentração utilizada, menor será a quantidade de moléculas do intercalante disponíveis para agir em células viáveis. O uso de baixas concentrações de EMA não afeta sua efetividade na supressão do sinal de células inviáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Alguns autores têm sugerido 10 µg/mL como a concentração mais adequada para estudos de viabilidade utilizando EMA (MINAMI *et al.*, 2010; SOEJIMA *et al.*, 2011a; SHI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2009).

Uma outra estratégia que também pode ser utilizada para minimizar a captação de EMA por células viáveis é a incubação das amostras no gelo ou em baixas temperaturas (4°C). Pelo fato de a temperatura ser um fator que influencia ativamente a permeabilidade de membrana, a incubação em baixas temperaturas pode diminuir a fluidez de membrana, diminuindo, conseqüentemente, a captação de EMA por células viáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Além disso, outros fatores podem influenciar o sucesso no uso do EMA, como as condições de exposição das amostras ao

intercalante e as condições de incubação sob as quais as mesmas são submetidas. Dessa forma, devido à natureza fotorreativa do grupamento azida, a exposição das amostras ao EMA deve ser realizada no escuro a fim de impedir que intercalante se ligue à moléculas inespecíficas, como a água. Ainda, deve-se atentar ao tempo de incubação das amostras, que deve ser o mais longo possível, para permitir que o EMA penetre nas células com membranas danificadas e se intercale ao DNA das mesmas. De forma geral, deve-se diminuir o tempo de incubação no escuro quando altas concentrações do corante são utilizadas, a fim de evitar a captação do mesmo por células viáveis. Vários autores sugerem 5 min de incubação no escuro como tempo suficiente para a ação adequada do intercalante (CAWTHORN & WITTHUHN *et al.*, 2008; CHANG *et al.* 2010; CHEN & CHANG *et al.*, 2010; GEDALANGA & OLSON *et al.*, 2009; GRAVIER *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2009; NOCKER *et al.*, 2006; NOCKER *et al.*, 2007b; SOEJIMA *et al.*, 2008).

Como já mencionado, a temperatura de incubação no escuro também possui papel fundamental na eficiência da técnica, uma vez que altas temperaturas podem alterar a permeabilidade de membrana, aumentando a captação de EMA por células viáveis. Isso resulta em sinais falso-negativos pela exclusão dos sinais de amplificação dessas células (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Um outro fator que também pode interferir na temperatura de incubação é o tipo de lâmpada utilizada na fotoativação. Assim, pelo fato de não gerarem calor, as lâmpadas de LED são as mais indicadas. Entretanto, lâmpadas halógenas podem igualmente ser utilizadas, desde que as amostras sejam incubadas em gelo para evitar o aquecimento excessivo das mesmas. Além disso, a incubação no gelo pode maximizar a exposição das amostras à luz devido a suas características reflexivas (FITTIPALDI *et al.*, 2012). O tempo de exposição à luz deve ser longo o suficiente para permitir a ativação da ligação ácido nucleico-EMA e inativar o excesso do intercalante presente em solução. O tempo requerido para ativação do complexo EMA-DNA pode variar de 2 a 20 min e depende da fonte de luz utilizada, da distância entre as amostras e a fonte de luz, do grau de turbidez das amostras e das características e propriedades de absorção de luz da matriz da amostra.

Outros trabalhos relatam, ainda, que o grau de captação do EMA por células viáveis depende de fatores como a espécie bacteriana estudada (FLEKNA *et al.*, 2007; NOCKER *et al.*, 2006), a concentração de EMA utilizada (KOBAYASHI *et al.*, 2009;

WANG *et al.*, 2009) e a densidade da suspensão bacteriana (FLEKNA *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2009). O alto número de células inviáveis presentes na amostra pode afetar negativamente a eficiência do método. Pan e Breidt (2007) relataram que a relação linear entre os valores de C_t e o número de células viáveis de *Listeria monocytogenes* foi afetada quando a relação entre células inviáveis e viáveis excedeu 10^4 e a concentração de células viáveis foi menor que 10^3 UFC/mL. A razão da influência do número de células inviáveis sobre a eficiência do método EMA-qPCR ainda não é clara. Sugere-se que o alto número de células inviáveis, capazes de captar o intercalante, possa diminuir a concentração de moléculas disponíveis por célula (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Além de todos os fatores já mencionados, Kramer *et al.* (2009) afirmam que matrizes complexas podem influenciar negativamente a eficiência do tratamento do EMA. Essas matrizes possuem componentes orgânicos e inorgânicos que podem interferir na fotoativação do intercalante (diminuindo a quantidade de luz necessária à fotoativação), além de causarem uma diminuição efetiva da concentração do corante (FITTIPALDI *et al.*, 2011b). Ainda em relação às características da matriz, altas concentrações de sal podem afetar negativamente a efetividade do ensaio (BOLTON & KEARNS, 1978 *apud* FITTIPALDI *et al.*, 2012). Isso ocorre devido a competição entre os íons sódio e as moléculas de EMA, ambos carregados positivamente, para se ligarem ao DNA, carregado negativamente (GRAVES *et al.*, 1981 *apud* FITTIPALDI *et al.*, 2012). Outros fatores referentes à matriz da amostra que podem influenciar negativamente o ensaio EMA-qPCR são a alta turbidez e o baixo pH. A turbidez aumentada de uma amostra pode ser causada pela presença de componentes orgânicos e inorgânicos na matriz ou pela alta densidade de micro-organismos, gerando grande quantidade de partículas em suspensão e dificultando, consequentemente, a captação de luz, por parte das células, necessária para a fotoativação do intercalante (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Ressalta-se, ainda, que amostras com pH ácido podem causar danos nas membranas celulares, levando ao aumento da permeabilidade de células viáveis ao intercalante. Além disso, a habilidade do EMA em suprimir sinais de amplificação de células inviáveis é diminuída em amostras com pH ácido, uma vez que a neutralização do DNA (carregado negativamente) enfraquece sua interação com o EMA (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Apesar de todas as condições mencionadas para a utilização do EMA aliado à qPCR, vários autores têm obtido sucesso na utilização dessa técnica para a pesquisa de patógenos em matrizes complexas (CHANG *et al.*, 2009; RUDI *et al.*, 2005a; RUDI *et al.*, 2005b; SHI *et al.*, 2011; SOEJIMA *et al.*, 2011a; WANG *et al.*, 2009). Tal fato confirma a grande utilidade do método tanto para a vigilância de alimentos quanto para o estabelecimento de diagnósticos rápidos em casos de surtos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS PURAS

Foram utilizadas as cepas padrão *Salmonella typhimurium* IAL 1472 e *Staphylococcus aureus* ATCC 51651, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. Uma alçada do estoque de cada cepa foi transferida para tubos contendo 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (*Oxoid Ltd., Basingstoke*, Inglaterra). Os tubos foram incubados a 35°C por 6 ± 2 h em *Incubator Shaker* (*New Brunswick Scientific Co. Inc.; Edison*, EUA) com agitação de 200 rpm. Posteriormente, foram feitas estrias em placas de Petri contendo ágar BHI (*Liofilchem®*, *Roseto Degli Itália*), sendo incubadas em estufa a 35°C por 14 ± 2 h. As placas foram, então, armazenadas em geladeira para utilização em, no máximo, quatro semanas.

Foi preparado o pré-inóculo transferindo-se colônias isoladas de *S. typhimurium* e de *S. aureus* (uma colônia isolada de cada patógeno) para tubos com tampa de rosca contendo 3 mL de caldo BHI. A incubação dos tubos foi feita a 35°C por 18 ± 2 h em *Incubator Shaker* (*New Brunswick Scientific Co. Inc.*) com agitação de 220 rpm. Em seguida, 200 µL de cada pré-inóculo foram transferidos para *Erlenmeyers* contendo 20 mL de caldo BHI, prosseguindo com incubação a 35°C em *Incubator Shaker* com agitação de 200 rpm, sendo o inóculo de *S. aureus* incubado por 3 h e o de *S. typhimurium* por 3 h 30 min (Figura 11).

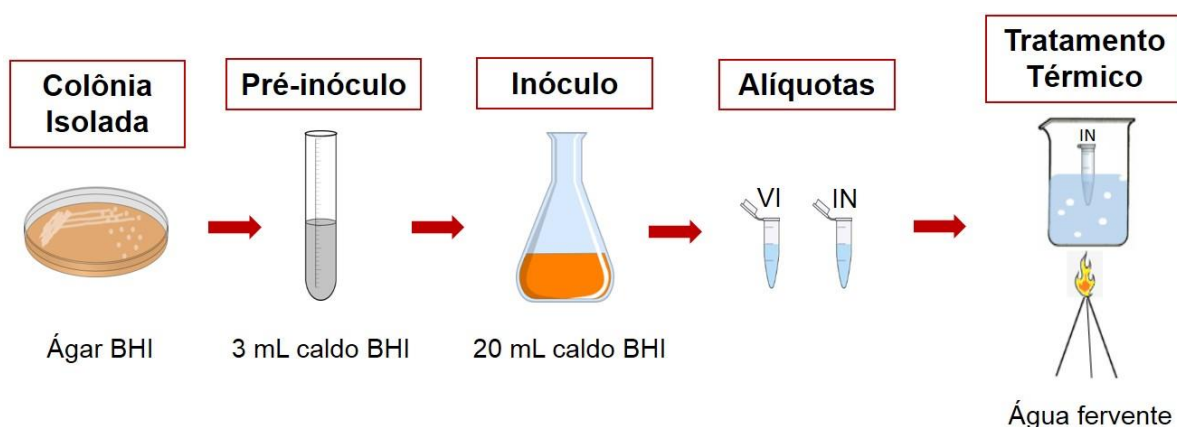


Figura 11. Preparo das suspensões de células viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. IN = suspensão de células inviáveis; VI = suspensão de células viáveis.

4.2 TRATAMENTO TÉRMICO

Após o período de incubação, as suspensões foram divididas em alíquotas de 500 µL. Em seguida, metade das alíquotas de *S. typhimurium* e *S. aureus* foi submetida ao tratamento térmico em água fervente por 15 min para inviabilização das células (Figura 11).

Posteriormente, foi realizada a diluição seriada das alíquotas contendo células viáveis dos patógenos em PBS 1X (KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 Mm) até 10⁻¹². As três últimas diluições (10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ e 10⁻¹²) de cada patógeno, bem como as suspensões inviáveis, foram semeadas em duplicata em placas de ágar BHI. As placas foram, então, incubadas em estufa a 35°C por 14 ± 2 h para posterior contagem das colônias e confirmação da inviabilidade das células nas suspensões submetidas ao tratamento térmico.

4.3 INOCULAÇÃO DOS PATÓGENOS EM AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO

As amostras de Queijo de Coalho, provenientes do estado do Ceará, foram previamente analisadas por testes microbiológicos no Laboratório de Microbiologia do Leite e Derivados do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig). As amostras positivas para *S. aureus* e *S. typhimurium* foram descartadas, enquanto aquelas comprovadamente negativas para esses patógenos foram armazenadas em sacos estéreis contendo 10 g de queijo e congeladas a -20°C para posterior utilização.

Para a inoculação dos patógenos, as amostras de queijo foram previamente descongeladas em bandeja com gelo. Em seguida, foram adicionados 89 mL de PBS 1X estéril às mesmas e homogeneizadas manualmente. Adicionou-se 1 mL das suspensões de células viáveis e inviáveis de *S. aureus* e de *S. typhimurium* contendo 10⁹ UFC/mL, formando uma “suspensão de queijo” (queijo + PBS 1X + suspensão bacteriana) com 10⁶ UFC/mL (Figura 12). Posteriormente, foi realizada a diluição seriada (até 10⁻⁶) das amostras inoculadas com culturas viáveis e o plaqueamento em duplicata das três últimas diluições (10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) em placas de ágar BHI (*Liofilchem*®). As amostras inoculadas com culturas inviáveis também foram

plaqueadas em duplicata para confirmação da inviabilidade das células. As “suspensões de queijo” foram divididas em alíquotas de 500 µL para a realização do tratamento com Brometo de Etídio Monoazida (EMA) (*Molecular Probes® - by Life Technologies™*, Eugene, EUA).

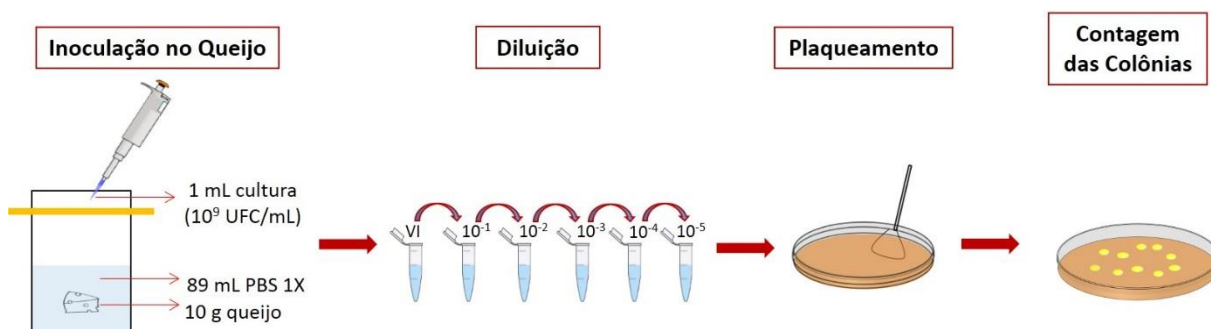


Figura 12. Inoculação das suspensões de células viáveis e inviáveis em amostras de Queijo de Coalho.

4.4 TRATAMENTO COM BROMETO DE ETÍDEO MONOAZIDA

O EMA foi adicionado às amostras de culturas puras de células viáveis e inviáveis dos patógenos nas concentrações 0, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL. Nas amostras de Queijo de Coalho inoculadas foram testadas as concentrações de 0, 5, 7,5, 10, 17,5, 25 e 50 µg/mL de EMA. Foram testados, ainda, quatro protocolos de fotoativação do intercalante, sendo um deles já utilizado pela equipe do Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite e três deles descritos por Soejima *et al.* (2011b), Soejima *et al.* (2008) e Flekna *et al.* (2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos testados para a fotoativação do EMA.

Protocolo	Tempo de escuro (min)	Temperatura no escuro (°C)	Tempo de exposição à luz (min)	Distância da fonte de luz (cm)	Referência
1	5	4	2	20	Flekna <i>et al.</i> (2007)
2	5	4	5	20	Soejima <i>et al.</i> (2008)
3	10	4	5	20	Soejima <i>et al.</i> (2011b)
4	5	Ambiente	15	15	LGM

Após a adição do corante às amostras, as mesmas foram incubadas no escuro com agitação de 200 rpm em banho seco (VHD - B1-AQR, Ningbo Utech International,

Shanghai, China) em diferentes tempos e temperaturas (Tabela 1). Em seguida, as amostras foram transferidas para bandejas contendo gelo e foram expostas à luz halógena 650 W (*Osram AS, Drammen, Noruega*), com diferentes distâncias entre as amostras e a fonte de luz e por diferentes tempos (Tabela 1) (Figura 13).

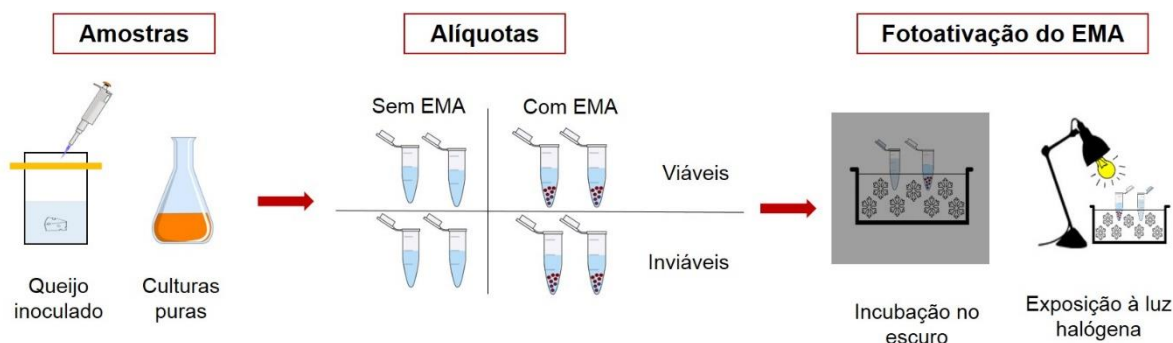


Figura 13. Tratamento das amostras com intercalante e fotoativação do EMA.

Após o tratamento com EMA, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante descartado. Os peletes foram, então, ressuspensos em 500 µL de PBS 1X para a extração de DNA.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

4.5.1 Culturas Puras

O DNA das culturas puras foi extraído utilizando o *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), utilizando-se protocolos distintos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme recomendações do fabricante. Alíquotas com 500 µL de amostras viáveis e inviáveis de *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min.

Os peletes obtidos após a centrifugação das alíquotas de *S. aureus* (Gram-positiva) foram ressuspensos em 180 µL de Tampão de Lise Enzimática (Tris-HCl pH 8,0 1,0 M, EDTA pH 8,00, 5 M, Triton X-100 1,2%) e 20 µL de lisozima a 20 mg/mL. As amostras foram incubadas por 30 min a 37°C em banho seco e, posteriormente, foram adicionados 25 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de tampão AL (tampão de lise) sem etanol (ambos fornecidos no kit). Após incubação a 56°C por 30 min, foram adicionados 200 µL de etanol às amostras e a mistura transferida para a coluna fornecida no kit.

Os peletes de *Salmonella* spp. (Gram-negativa) foram ressuspensos em 180 μ L de tampão AL. Em seguida, foram adicionados 20 μ L de proteinase K e foi feita incubação a 56°C por 1 h. Foram adicionados 200 μ L do tampão AL, seguido de agitação no vórtex das amostras e adição de 200 μ L de etanol. A mistura foi, então, transferida para a coluna. A partir daí, seguiu-se os mesmos procedimentos para as ambos os patógenos.

As colunas foram centrifugadas a 8.000 x g por 2 min e o efluxo descartado. Foram adicionados 500 μ L do tampão AW1, seguindo-se de nova centrifugação a 8.000 x g por 1 min. Posteriormente, foram adicionados 500 μ L do tampão AW2 e, novamente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 20.000 x g. As colunas foram, então, transferidas para microtubos e foram adicionados 110 μ L do tampão AE (tampão de eluição) diretamente na membrana de cada coluna. As amostras foram incubadas por 1 min a temperatura ambiente e centrifugadas a 8.000 x g pelo mesmo tempo. Para que se obtivesse máxima concentração de DNA, o efluxo foi pipetado diretamente na membrana, seguindo-se nova centrifugação.

4.5.2 Amostras de Queijo Coalho Inoculado

Para a extração de DNA das amostras de queijo inoculado foi utilizado o reagente *PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 400 μ L de PrepMan™ às amostras, sendo as mesmas submetidas à agitação no vórtex para homogeneização completa. Em seguida, foram aquecidas a 100°C em banho seco por 10 min. Posteriormente, foi realizada nova centrifugação a 12.000 x g por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

A verificação da qualidade e quantificação das amostras de DNA foram feitas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, *NanoDrop Technologies*, Wilmington, DE, EUA). As amostras foram armazenadas a -20°C para uso posterior.

4.6 PCR EM TEMPO REAL

As qPCR foram realizadas em multiplex, utilizando-se TaqMan® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - by Life Technologies™, Foster City, CA, EUA) na concentração 1X, 50 nM de cada *primer* para *S. typhimurium* e 100 nM para *S. aureus*, 300 nM das sondas de *S. typhimurium* e *S. aureus* (Tabela 2) e 50 ng de DNA de *S. aureus* e 200 ng de DNA de *S. typhimurium*, com volume final de 25 µL em cada reação (Tabela 3).

Tabela 2. Sequência dos *primers* e sondas utilizados.

Espécie-alvo	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3') e da sonda	Referência
<i>Salmonella typhimurium</i>	F: ATAAATCCGGCGGCCTGATG R: TGGTATCGACGCCTTTATCTGAGA P: 5'VIC-TTACACCGGAGTGGATTAAACGGCTGGG-MGB3'	PIKNOVÁ <i>et al.</i> (2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	F: TGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAA R: TGCACTATATACTGTTGGATCTTCAGAA P: 5'FAM-TGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAG-MGB3'	SHORTLE, 1983

Tabela 3. Componentes utilizados em uma reação *multiplex* de qPCR com volume final de 25 µL.

Estoque	Concentração da solução estoque	Concentração final na reação	Volume 1 Rx
TaqMan	2X	1 X	12,5 µL
Primer SAL F	10 µM	50 nM	0,1 µL
Primer SAL R	10 µM	50 nM	0,1 µL
Primer AUR F	10 µM	100 nM	0,3 µL
PrimerAUR R	10 µM	100 nM	0,3 µL
Sonda SAL	10 µM	300 nM	0,8 µL
Sonda AUR	10 µM	300 nM	0,8 µL
DNA SAL	50 ng/µL	200 ng	4,0 µL
DNA AUR	50 ng/µL	50 ng	1,0 µL
Água MilliQ			5,3 µL
Volume total			25 µL

SAL: *Salmonella typhimurium*; AUR: *Staphylococcus aureus*

As reações foram feitas em duplicata em placas ópticas de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no equipamento ABI Prism 7300 *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). As seguintes etapas de termociclagem foram utilizadas nesse trabalho:

- **50°C por 2 min** para atividade ótima da enzima Uracil N-glicosilase (UNG - incluída no kit TaqMan *Universal PCR MasterMix*). O tratamento com essa enzima remove qualquer uracila ligada ao cDNA (LONGO *et al.*, 1990 *apud* APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).
- **10 min a 95°C** para ativação da enzima *AmpliTaq Gold*. Além disso, essa incubação é necessária para reduzir substancialmente a atividade da enzima UNG e desnaturar o DNA (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).
- **40 ciclos de 95°C por 15 s** para desnaturação e 60°C por 1 min para anelamento dos *primers* e das sondas e extensão (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).

Os dados foram obtidos como valores de C_t , que representa o ciclo no qual a amplificação atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*threshold*).

4.7 CÁLCULO DO SINAL DE REDUÇÃO DO EMA (EMASR)

Os valores de C_t foram, ainda, analisados de acordo com a equação do Sinal de Redução do EMA ou EMASR. Para o cálculo, utilizou-se os valores de eficiência da reação (Equação 1) previamente calculados por Sá (2012).

$$E = \left(10^{(-1/\text{slope})} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

Brevemente, foram testadas três concentrações de DNA tanto de *S. aureus* quanto de *S. typhimurium* (50, 100 e 200 ng/reação) e três concentrações dos *primers* Forward e Reverse de cada alvo (50, 100 e 200 nM) em reações monoplex.

As melhores condições foram obtidas com concentração de *primers* de 100 nM para ambos os patógenos, gerando valores de eficiência de 0,5 e 0,4 para *S. aureus* e *S. typhimurium*, respectivamente.

De posse desses valores, calculou-se o EMASR (Equação 2), que representa a fração do DNA que pode ser amplificada por qPCR nas amostras tratadas com EMA (RUDI *et al.*, 2005a; RUDI *et al.*, 2005b; NOVGA *et al.*, 2003). Nesta equação, “E” representa a eficiência de amplificação.

$$EMASR = \frac{(1+E)^{C_{t_{\text{não tratadas}}}}}{(1+E)^{C_{t_{\text{tratadas}}}}}$$

(2)

4.8 LIMITE DE DETECÇÃO

Para o cálculo do limite de detecção da técnica, quantidades decrescentes de células viáveis foram inoculadas em amostras de 10 g de Queijo de Coalho. Essas amostras (armazenadas em sacos estéreis) foram homogeneizadas manualmente com 89 mL de PBS 1X também estéril. As suspensões de culturas puras de *S. typhimurium* foram, então, diluídas serialmente até 10^{-5} . Em seguida, cada amostra de queijo foi inoculada com 1 mL de cada diluição, realizando-se nova homogeneização manual. De maneira semelhante, amostras de Queijo de Coalho também foram inoculadas com 1 mL de suspensões puras de células viáveis e inviáveis de *S. typhimurium*. Para o controle negativo, foram usadas amostras que continham somente 10 g de Queijo de Coalho e 90 mL de PBS 1X, sem inoculação de células viáveis ou inviáveis (Figura 14).

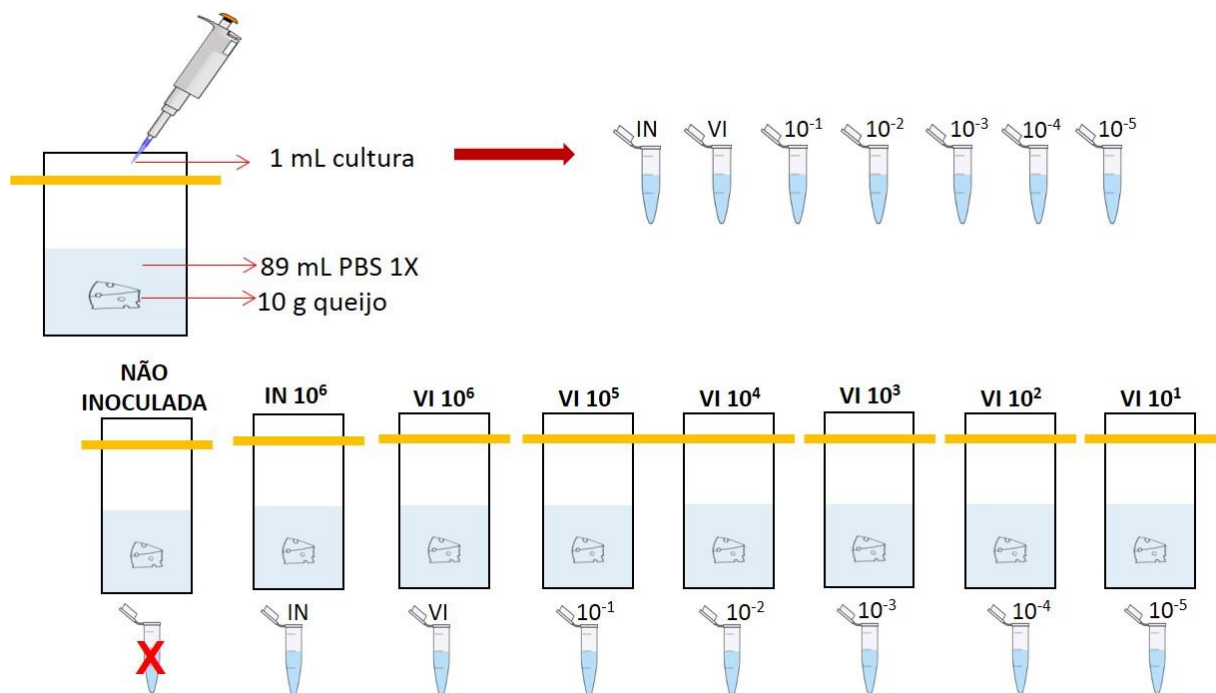


Figura 14. Inoculação das suspensões de células viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* em amostras de Queijo de Coalho. IN = suspensão de células inviáveis; VI = suspensão de células viáveis

Foi realizado o plaqueamento em duplicata de cada uma das diluições em ágar MacConkey (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e as placas foram incubadas a 35°C por 18 ± 2 h para posterior contagem das colônias.

Pelo fato de ser possível e, até mesmo, comum a presença de células inviáveis em Queijo de Coalho (devido ao tratamento térmico prévio que deve ser realizado no leite cru), foram feitas alíquotas mistas das amostras inoculadas com células viáveis e inviáveis para tratamento com EMA. Dessa forma, foi possível avaliar a capacidade do protocolo estabelecido em detectar a menor concentração de células viáveis em meio a concentrações constantes de células inviáveis.

Assim, cada alíquota de 500 μ L foi formada por 250 μ L da amostra inoculada com células inviáveis e 250 μ L das amostras inoculadas com concentrações decrescentes de células viáveis. Da mesma forma, foram feitas alíquotas de 500 μ L das amostras não inoculadas - controles negativos - para tratamento com o intercalante (Figura 15).

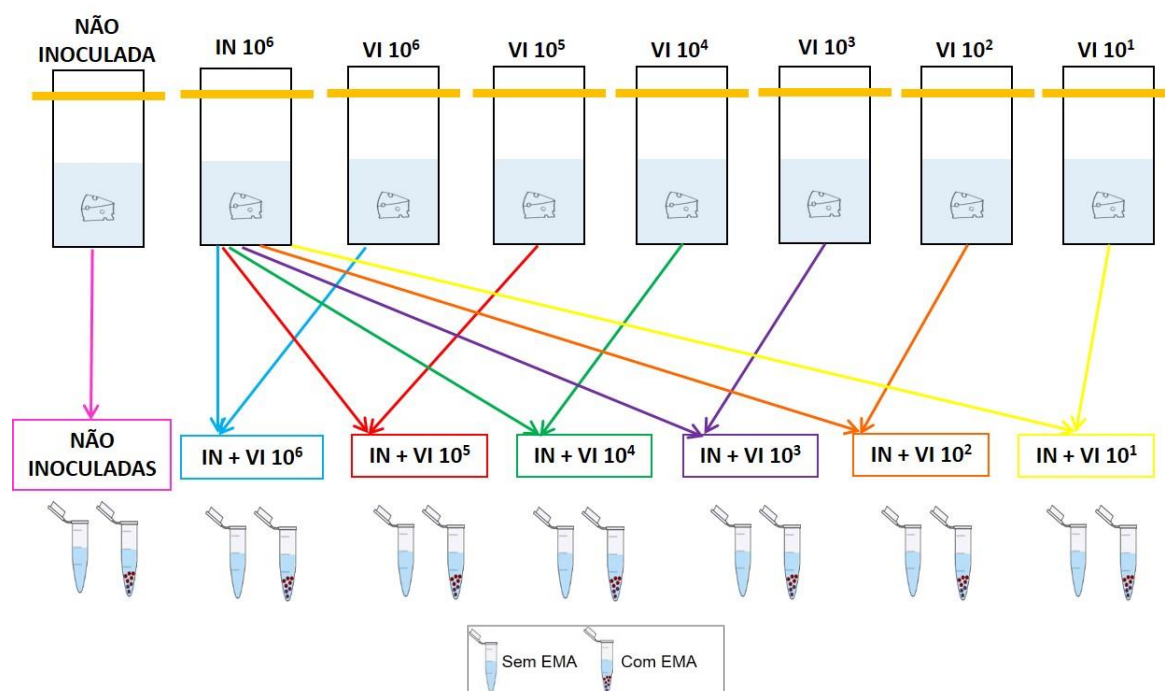


Figura 15. Esquema de formação das alíquotas para tratamento com EMA. IN = células inviáveis; VI = células viáveis

O tratamento com EMA foi realizado adicionando-se 25 μ L do intercalante (1 mg/mL) em metade das alíquotas formadas, resultando em uma concentração final de 50 μ g/mL. A outra parte das alíquotas foi o controle (sem EMA). As amostras foram, então, submetidas à incubação no escuro a 4°C por 5 min. Em seguida, foram

expostas à luz halógena em bacia com gelo por 5 min e a uma distância de 20 cm da fonte de luz.

Após a fotoativação do EMA, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante descartado. A partir daí iniciou-se o protocolo de extração de DNA com PrepMan™ (*Applied Biosystems*®, EUA) conforme descrito no item 4.5.2.

Em seguida, as qPCR foram realizadas em monoplex utilizando-se TaqMan® *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*®) com volume final da reação de 25 µL (Tabela 4). O equipamento e as condições de termociclagem foram as mesmas já descritas no item 4.6.

Tabela 4. Componentes utilizados em uma reação monoplex de qPCR.

Estoque	Concentração da solução estoque	Concentração final na reação	Volume 1 Rx
TaqMan	2X	1 X	12,5 µL
Primer SAL F	10 µM	50 nM	0,1 µL
Primer SAL R	10 µM	50 nM	0,1 µL
Sonda SAL	10 µM	300 nM	0,8 µL
DNA SAL	50 ng/µL	200 ng	4,0 µL
Água MilliQ			7,5 µL
Volume total			25 µL

SAL: *Salmonella typhimurium*

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados segundo o delineamento de blocos ao acaso em esquema de parcela subdividida, sempre com quatro réplicas por parcela. Cada réplica era representada por uma repetição laboratorial, em quem foram realizados pares de duplicatas, aceitas somente quando o Coeficiente de Variação (CV) era menor ou igual a 5%. O tratamento da parcela para os estudos de cultura pura e de inoculação de queijo foi a viabilidade das células (viáveis e inviáveis) (Figura 16). Já para a determinação do limite de detecção, o tratamento da parcela foi a concentração de células (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 UFC/mL) (Figura 17). O tratamento da subparcela, em qualquer caso, foi sempre o uso do intercalante EMA (0 µg/mL ou 50 µg/mL).

Foram utilizados 4 blocos para os experimentos de cultura pura e de limite de detecção, 11 para os de Queijo de Coalho inoculado, e 8 para o estudo sobre a melhor

concentração de EMA a ser utilizada em amostras de Queijo de Coalho, sendo os blocos representados pelas datas da experimentação (Figura 16).

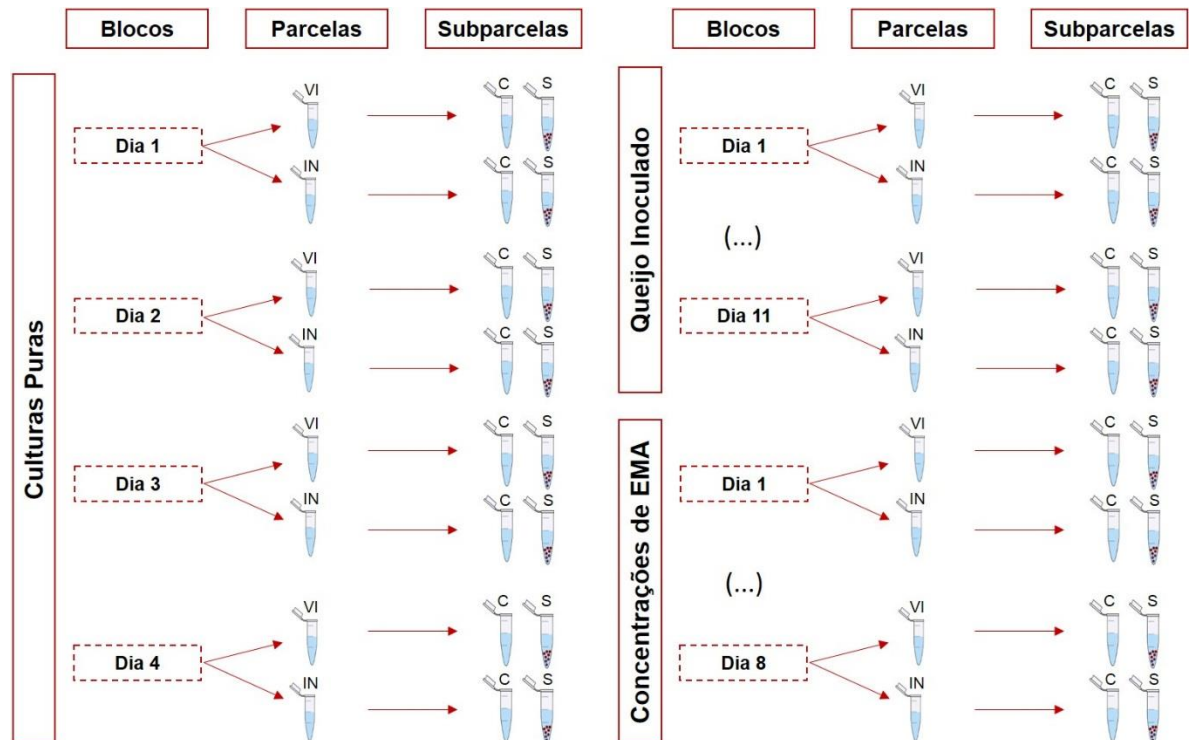


Figura 16. Esquema do delineamento estatístico em parcelas subdivididas realizado para experimentações em culturas puras, Queijo de Coalho inoculado e determinação da melhor concentração de EMA a ser utilizada em amostras de Queijo de Coalho inoculado. VI = células viáveis; IN = células inviáveis; C = com EMA; S = sem EMA.

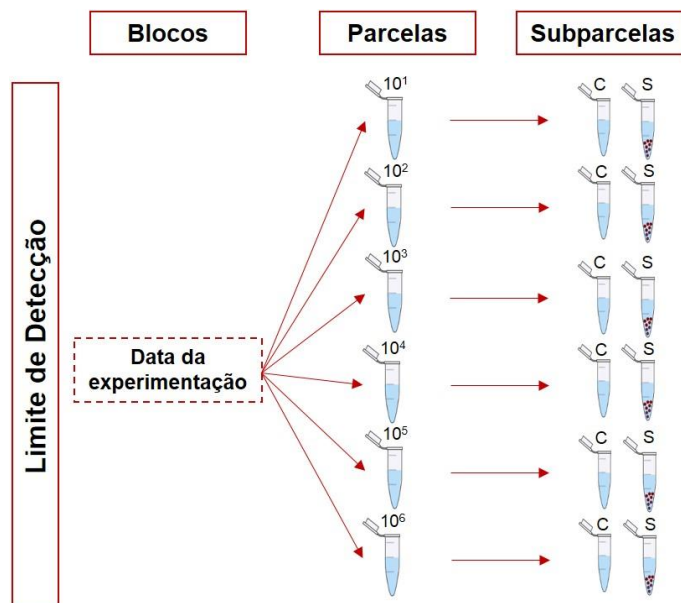


Figura 17. Esquema do delineamento estatístico em parcelas subdivididas para determinação do limite de detecção da técnica. $10^1 = 10^1$ UFC/10 g de queijo; $10^2 = 10^2$ UFC/10 g de queijo; $10^3 = 10^3$ UFC/10 g de queijo; $10^4 = 10^4$ UFC/10 g de queijo; $10^5 = 10^5$ UFC/10 g de queijo; $10^6 = 10^6$ UFC/10 g de queijo; C = com EMA; S = sem EMA.

Os dados de cultura pura e de queijo inoculado foram submetidos à ANOVA. Uma vez significativo o efeito da interação “viabilidade” x “intercalante”, procedeu-se ao seu desdobramento, pelo teste F, nos dois sentidos: testando o efeito do uso do corante sobre as células viáveis e também sobre as inviáveis, e testando o efeito da viabilidade sob a ausência e sob a presença do corante.

A determinação da melhor concentração de EMA para os experimentos foi baseada na diferença entre as médias de C_t observadas para células viáveis e inviáveis de uma mesma concentração, relativizada pelo desvio-padrão das repetições desta mesma concentração. A maior diferença relativa foi tomada como indicativa da melhor concentração de EMA para ser empregada nos estudos de detecção.

Os dados oriundos do estudo sobre o limite mínimo de detecção foram submetidos à ANOVA seguida pelo Teste de Dunnett, para comparações com o controle. Para a comparação dos dados oriundos das amostras inoculadas com diferentes concentrações de células viáveis entre si, foi realizado o Teste F (ANOVA).

Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico SAS, versão 9.2 (SAS Institute Inc., 2009), utilizando-se do procedimento MIXED, e os gráficos foram gerados no pacote computacional R, versão 3.1.3 (R Core Team, 2015). Em todos os testes, diferenças entre médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTURAS PURAS

Dentre os diferentes protocolos de fotoativação do EMA testados (item 4.4), os melhores resultados foram obtidos com a utilização do protocolo 2 que consistiu em incubação das amostras no escuro a 4°C por 5 min, seguida de exposição à luz halógena de 650 W a uma distância de 20 cm em bacia com gelo por 5 min. A maior eficiência do protocolo 2 em relação aos demais pode ser verificada a partir da análise das diferenças nos valores médios de C_t entre as amostras viáveis e inviáveis, sendo de aproximadamente 10 ciclos para *S. typhimurium* e 14 ciclos para *S. aureus* (Figura 18).

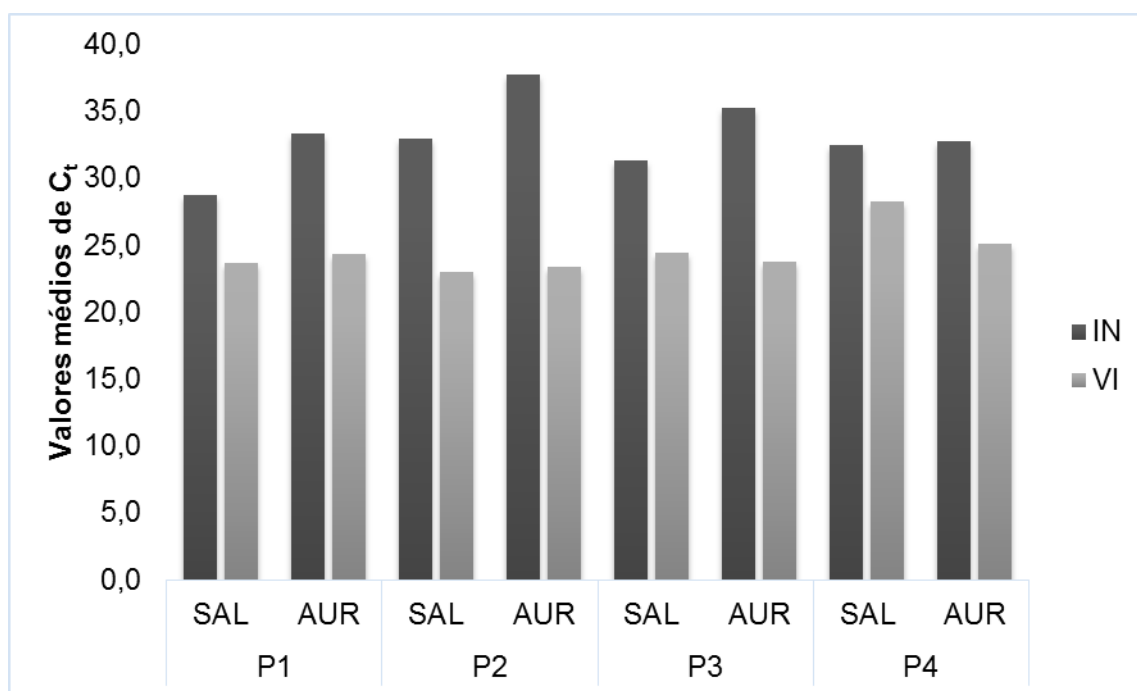


Figura 18. Valores médios de C_t obtidos com os diferentes protocolos de fotoativação do EMA. P1 = Protocolo 1 (5 min de incubação no escuro a 4°C e 2 min de exposição à luz em gelo com 20 cm de distância entre as amostras e a fonte de luz); P2 = protocolo 2 (5 min de incubação no escuro a 4°C e 5 min de exposição à luz em gelo com 20 cm de distância entre as amostras e a fonte de luz); P3 = protocolo 3 (10 min de incubação no escuro a 4°C e 5 min de exposição à luz em gelo com 20 cm de distância entre as amostras e a fonte de luz); P4 = protocolo 4 (5 min de incubação no escuro em temperatura ambiente e 15 min de exposição à luz em gelo com 15 cm de distância entre as amostras e a fonte de luz). SAL = *S. typhimurium*; AUR = *S. aureus*. IN = inviáveis; VI = viáveis.

Devido à natureza altamente fotorreativa do EMA, conferida pela presença do grupamento azida, é fundamental que ocorra a incubação inicial no escuro. É durante esse período que as moléculas do intercalante se distribuem homogeneamente e penetram nas células com membrana danificada (inviáveis), ligando-se ao seu DNA.

Na incubação no escuro, dois principais fatores devem ser considerados: tempo e temperatura de incubação. O tempo de incubação deve ser o maior possível para permitir a entrada do corante nas células inviáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Entretanto, em concentrações de EMA maiores que 10 µg/mL, esse tempo deve ser reduzido, para que haja o mínimo de penetração do corante nas células viáveis. Vários autores têm sugerido o tempo de incubação de 5 min no escuro como satisfatório (CAWTHORN & WITTHUHN *et al.*, 2008; CHANG *et al.* 2010; CHEN & CHANG *et al.*, 2010; GEDALANGA & OLSON *et al.*, 2009; GRAVIER *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2009; NOCKER *et al.*, 2006; NOCKER *et al.*, 2007b; SOEJIMA *et al.*, 2008). Dada a natureza indefinida de captação do corante por células viáveis, tanto o transporte passivo quanto a difusão facilitada tornam-se possíveis. Dessa forma, a difusão passiva pode ser mais dependente da temperatura, uma vez que a fluidez de membrana é altamente influenciada pela temperatura. Assim, a incubação de amostras tratadas com EMA a baixas temperaturas (4°C), é importante para reduzir o acúmulo do intercalante em células viáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

A ligação covalente entre o EMA e o DNA das células ocorre após a fotoativação (exposição das amostras à luz halógena). Ainda nessa etapa, as moléculas do intercalante que não penetraram em nenhuma célula, ligam-se covalentemente a moléculas de água e são, dessa forma, inativadas. Caso não ocorra a inativação, as moléculas de EMA em excesso podem ligar-se ao DNA de células viáveis durante a etapa de extração do DNA, impedindo sua amplificação na qPCR. Por isso, é recomendável que este procedimento seja realizado com as amostras imersas em gelo, pois além de prevenir o aquecimento excessivo das mesmas, maximiza a exposição à luz devido às suas características reflexivas (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Foram testadas diferentes concentrações do EMA em culturas puras utilizando o protocolo 2 como padrão para fotoativação. As maiores diferenças entre os valores de C_t das amostras viáveis e inviáveis, tanto de *S. typhimurium* quanto de *S. aureus*, foram obtidas com a concentração de 50 µg/mL (Figura 19).

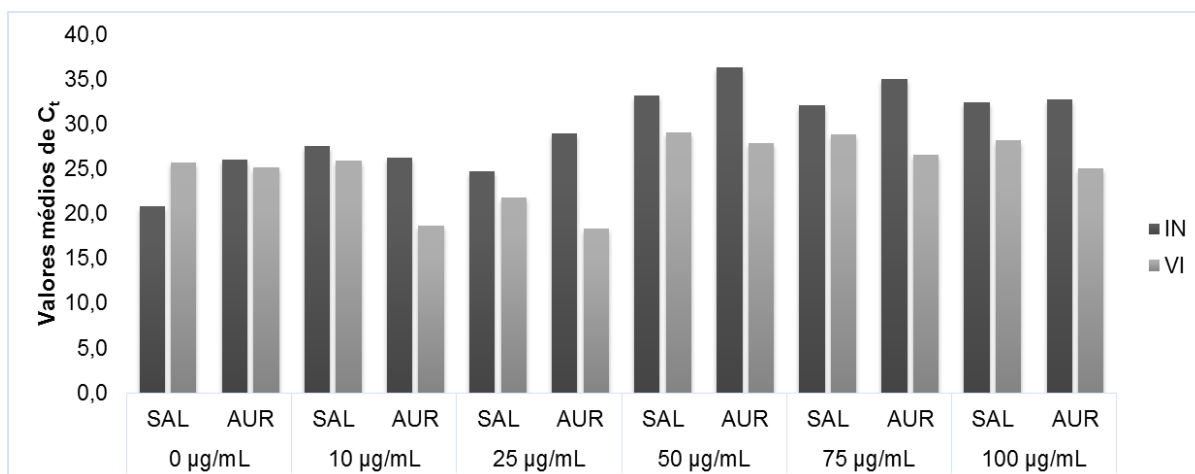


Figura 19. Valores médios de C_t obtidos com as diferentes concentrações de EMA testadas. SAL = *S. typhimurium*; AUR = *S. aureus*. IN = inviáveis; VI = viáveis.

Nocker *et al.* (2006) afirmaram que o EMA é capaz de penetrar em células viáveis sob diversas circunstâncias, sendo o uso de altas concentrações do intercalante uma delas (FLEKNA *et al.*, 2007). Soejima *et al.* (2007) concluíram que concentrações de EMA maiores do que 100 µg/mL podem, inclusive, ter efeito citotóxico e esse efeito é tanto maior quanto maior for a concentração usada (FLEKNA *et al.*, 2007). Outros estudos compararam diferentes concentrações de EMA e concluíram que o uso de 10 a 20 µg/mL do intercalante é suficiente para inibir a amplificação do DNA de células inviáveis sem, no entanto, penetrar em células viáveis (CHANG *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2009). Contudo, no presente trabalho, o efeito esperado do EMA não foi alcançado com o uso de concentrações menores do que 50 µg/mL em culturas puras, principalmente para *S. typhimurium*.

A concentração de células submetidas ao tratamento com EMA foi, em média, 10^6 UFC/mL. Fittipaldi *et al.* (2010) ressaltaram a importância do número de células inviáveis na reação, uma vez que, quando em altas concentrações, podem ocasionar resultados falso-positivos. Tal efeito ainda não foi completamente esclarecido. Entretanto, sugere-se que a presença de um grande número de células inviáveis com alta capacidade de absorção do EMA diminua a disponibilidade de moléculas do intercalante por célula. Além disso, o alto número de células presentes na reação pode aumentar a turbidez do meio, influenciando negativamente na ação do EMA sobre células inviáveis (FITTIPALDI *et al.*, 2012).

Ao realizar testes em *multiplex* para a identificação de células viáveis de *S. typhimurium* e *S. aureus* em culturas puras esperava-se observar diferença

altamente significativa entre as amostras inviáveis tratadas e não tratadas com EMA para ambos os patógenos. Já para as células viáveis não era esperado o efeito do EMA sobre as mesmas. Sendo assim, esperava-se não observar diferença estatística entre as amostras viáveis tratadas e não tratadas com EMA para ambos os patógenos.

Diferença altamente significativa foi encontrada entre as amostras inviáveis de *S. typhimurium* com e sem EMA ($p < 0,0001$). Contudo, uma diferença menos significativa ($p < 0,001$) também foi observada entre os valores médios de C_t das amostras viáveis tratadas e não tratadas com o intercalante (Figura 20 A).

Para *S. aureus*, o resultado obtido não foi o esperado, uma vez que foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras inviáveis com e sem EMA e também entre as amostras viáveis tratadas ou não pelo intercalante (Figura 20 B) ($p < 0,05$).

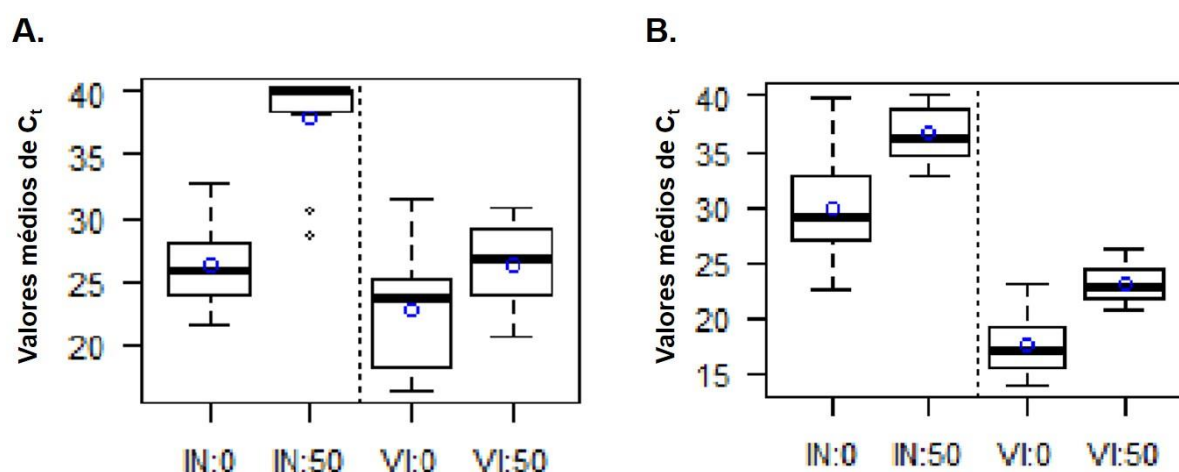


Figura 20. Valores médios de C_t de amostras viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* (A) e *Staphylococcus aureus* (B), tratadas e não tratadas com EMA. C_t = valores médios de C_t ; VIAB. = viabilidade das células; TRAT. = tratamento com EMA empregado (0 $\mu\text{g/mL}$ ou 50 $\mu\text{g/mL}$); IN = células inviáveis; VI = células viáveis. (A) Teste F ($p < 0,001$); (B) Teste F ($p < 0,05$).

Esses resultados mostram que o EMA é efetivo em inibir a amplificação de células inviáveis. Entretanto, sugerem que há uma interação do intercalante com o DNA das células viáveis, causando uma subestimação dessa população bacteriana.

No presente estudo, não foi possível diferenciar células viáveis e inviáveis de *S. aureus* com o uso do EMA, uma vez que o intercalante teve efeito significativo em ambas populações (viáveis e inviáveis). Esse resultado corrobora com o alcançado

por Kobayashi *et al.* (2009), que afirmaram que o EMA é incapaz de diferenciar células viáveis e inviáveis de *S. aureus*.

O EMASR calculado para as amostras inviáveis de *S. typhimurium* diminuiu 15 vezes em relação às viáveis. Já para *S. aureus*, essa diminuição foi de apenas 1,7 vezes (Figura 21). O EMASR representa a fração do DNA que pode ser amplificada por qPCR nas amostras tratadas com EMA (RUDI *et al.*, 2005a), variando de 0 a 1. O valor de EMASR calculado para amostras inviáveis deve ser o menor possível, indicando que uma pequena ou nenhuma fração do DNA dessas células pode ser amplificada após o tratamento com o intercalante. Já para as amostras viáveis, o ideal é que o valor de EMASR seja o maior possível, confirmando a incapacidade do EMA em ligar-se ao DNA dessas células e impedir sua amplificação.

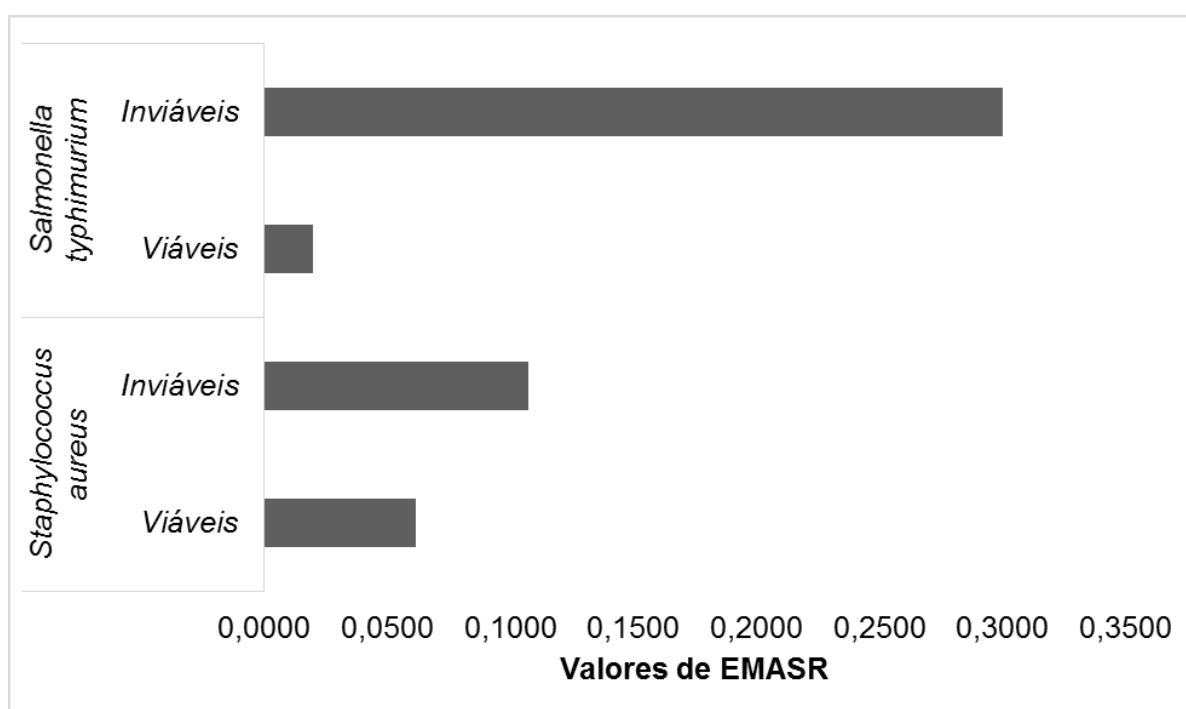


Figura 21. Valores de EMASR calculados para amostras viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. EMASR = Sinal de Redução do EMA.

5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO

Foi observada diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os valores médios de C_t das amostras viáveis tratadas e não tratadas com EMA tanto de *S. typhimurium* (Figura 22 A) quanto de *S. aureus* (Figura 22 B). Como em culturas puras, esses resultados indicam que o EMA também teve influência sobre o sinal de amplificação

do DNA de células viáveis dos dois patógenos, provavelmente devido à concentração do intercalante utilizada (50 µg/mL). Entretanto, a ação do EMA sobre as células viáveis de *S. aureus* foi mais significativa ($p < 0,001$) do que sobre as células viáveis de *S. typhimurium* ($p < 0,0001$). Como já citado anteriormente, a ação do EMA sobre células viáveis depende da espécie bacteriana estudada, sendo *S. aureus* uma das espécies mais afetadas (KOBAYASHI *et al.*, 2009).

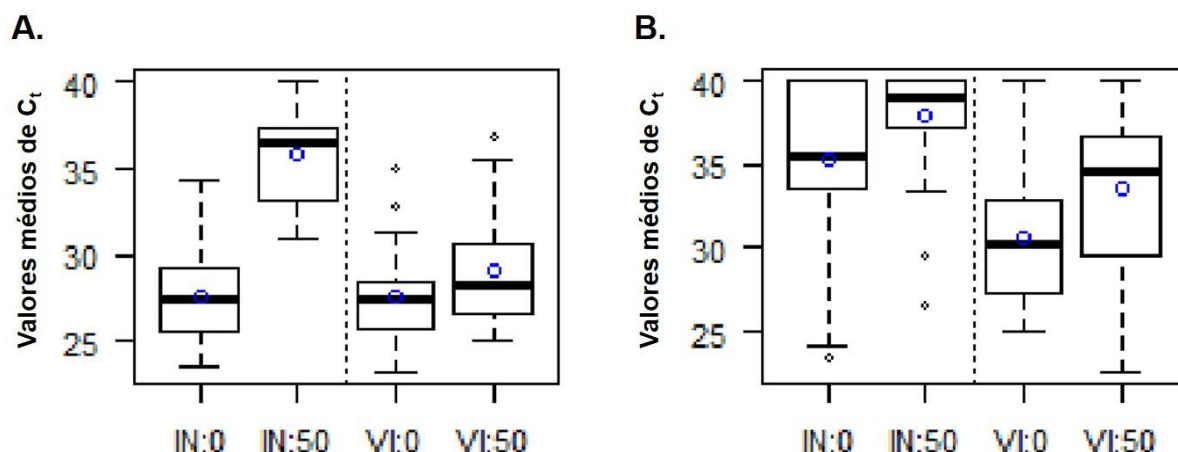


Figura 22. Valores médios de C_t de amostras viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) em Queijo de Coalho inoculado, tratadas e não tratadas com EMA. C_t = valores médios de C_t ; VIAB. = viabilidade das células; TRAT. = tratamento com EMA empregado (0 µg/mL ou 50 µg/mL); IN = células inviáveis; VI = células viáveis. (A) Teste F ($p < 0,0001$); (B) Teste F ($p < 0,001$).

Observou-se um aumento geral nos valores de C_t das amostras de *S. typhimurium* e *S. aureus* inoculadas no Queijo de Coalho em relação aos obtidos em culturas puras. Kramer *et al.* (2009) afirmaram que matrizes complexas, como é o caso do Queijo de Coalho, podem influenciar negativamente a eficiência do tratamento com EMA, pois além da diminuição da concentração efetiva do intercalante por absorção química, componentes orgânicos e inorgânicos podem interferir no processo de fotoativação (FITTIPALDI *et al.*, 2011b). Ademais, Fittipaldi *et al.* (2012) afirmaram que outros fatores relativos à matriz da amostra também podem afetar negativamente a eficiência do EMA. Altas concentrações de sal presentes na amostras podem causar um maior choque osmótico, levando a um aumento na redução de sinal, tanto de células viáveis, quanto inviáveis (SHI *et al.*, 2011). Além disso, amostras com turbidez elevada, causada pela presença de compostos orgânicos e inorgânicos na matriz, podem reduzir a incidência de luz necessária para fotoativação do intercalante, afetando negativamente a eficiência do EMA (FITTIPALDI *et al.*, 2012). Ainda, Shapiro

et al. (2003) apud Fittipaldi et al. (2014) afirmaram que amostras com pH ácido podem diminuir a habilidade do EMA em suprimir sinais de amplificação de células inviáveis, uma vez que a interação entre o EMA e o DNA é enfraquecida nessa condição. Assim, pode-se afirmar que o aumento observado nos valores médios de C_t das amostras viáveis e inviáveis de *S. typhimurium* e *S. aureus*, tratadas ou não com o intercalante, foi causado pelas características da matriz (Queijo de Coalho) presentes na amostra.

O EMASR calculado para as amostras inviáveis de *S. typhimurium* inoculadas em Queijo de Coalho foi 11 vezes menor do que o EMASR calculado para as amostras viáveis. Porém, para *S. aureus*, essa diminuição foi de apenas 1,8 vezes (Figura 23). Esse resultado indica, mais uma vez, a eficácia do EMA em diferenciar células viáveis e inviáveis de *S. typhimurium*, mesmo em matriz alimentar. Ao passo que demonstra a inabilidade do intercalante em possuir o mesmo efeito sobre amostras inoculadas com *S. aureus*.

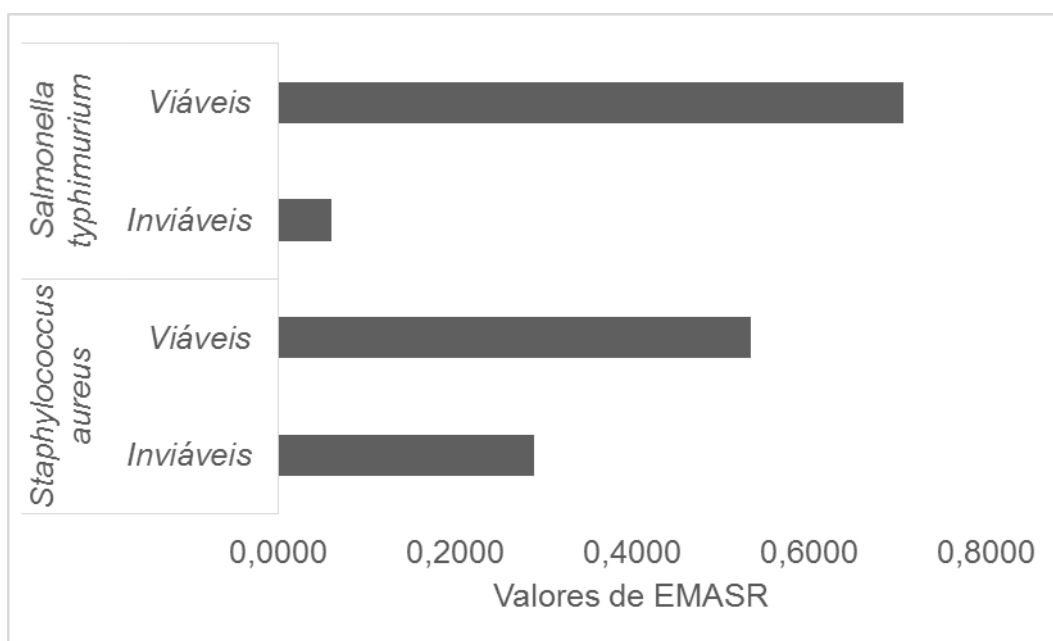


Figura 23. Valores de EMASR calculados para amostras viáveis e inviáveis de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* inoculadas em amostras de Queijo de Coalho. EMASR = Sinal de Redução do EMA.

Pelo fato de ter sido observado um possível efeito da concentração do EMA sobre o sinal de amplificação de células viáveis, outras concentrações do intercalante foram testadas em amostras de queijo inoculadas (item 4.4). Dentre as concentrações testadas, 50 µg/mL foi a que gerou os melhores resultados para *S. typhimurium* (Figura 24 A).

Para as amostras de *S. aureus* nenhuma das concentrações testadas apresentou resultado satisfatório, uma vez que em todas elas houve influência do intercalante sobre o sinal de amplificação das células viáveis (Figura 24 B).

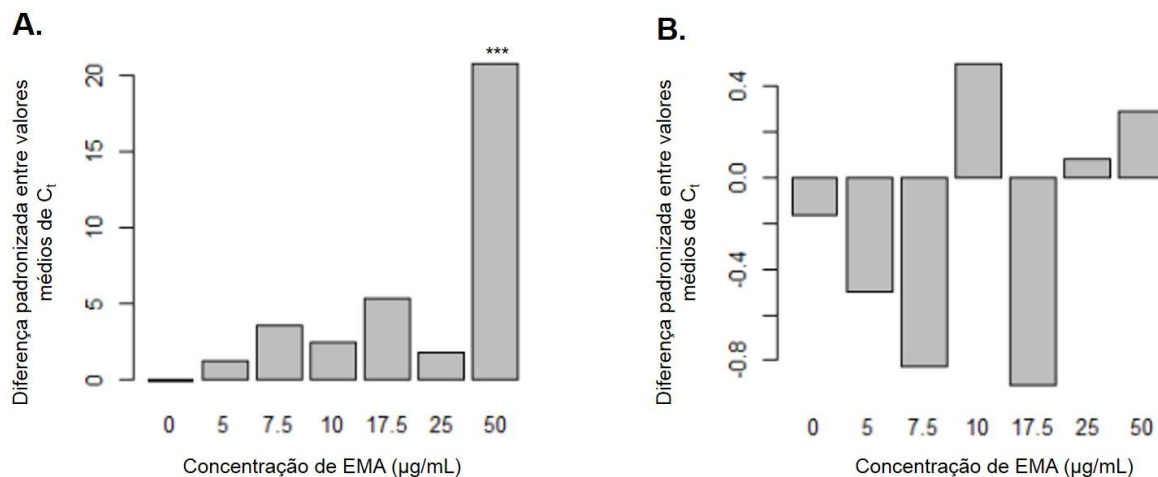


Figura 24. Diferenças médias relativas para as diferentes concentrações de EMA testadas em amostras de Queijo de Coalho inoculadas com (A) *Salmonella typhimurium* e (B) *Staphylococcus aureus*. Teste F ($p < 0,0001$).

Apesar de vários autores sugerirem 10 µg/mL ser a concentração ideal de EMA para diferenciação de células viáveis e inviáveis (MINAMI et al., 2010; SHI et al., 2011; SOEJIMA et al., 2011a; WANG et al., 2009), no presente trabalho observou-se que quanto maior a concentração de EMA utilizada (até 50 µg/mL), maior era a diferenciação de células viáveis e inviáveis para amostras de *S. typhimurium*. Já para *S. aureus*, foi observado efeito inverso, ou seja, concentrações menores de EMA apresentaram melhores resultados para a diferenciação entre células viáveis e inviáveis. Esse resultado confirma o fato de a captação do EMA por células viáveis ser dependente da espécie estudada e da concentração de EMA utilizada, conforme já relatado por FLEKNA et al., 2007 e NOCKER et al., 2006.

De posse dessas informações, verificou-se que o *multiplex* utilizado no estudo (*S. typhimurium* e *S. aureus*) não apresenta bons resultados para detecção de viabilidade das células por qPCR combinada ao uso do EMA em amostras de Queijo de Coalho inoculadas. Dessa forma, seguiu-se o estudo utilizando amostras de queijo inoculadas apenas com *S. typhimurium*. Pelo fato de o PMA possuir efeito menos significativo sobre células viáveis (FITTIPALDI et al., 2012), apesar de sua menor capacidade de diferenciação de células viáveis e inviáveis em relação ao EMA, um

estudo para detecção de células viáveis de *S. aureus* e *S. typhimurium* em multiplex pode ser realizado utilizando PMA combinado à qPCR.

5.3 LIMITE DE DETECÇÃO

Para o cálculo do limite de detecção da técnica foram usadas alíquotas mistas de células viáveis e inviáveis inoculadas em Queijo de Coalho a fim de se avaliar a capacidade do protocolo estabelecido em detectar a menor concentração de células viáveis em meio a concentrações constantes de células inviáveis.

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os valores médios de C_t das amostras tratadas e não tratadas com EMA (50 $\mu\text{g/mL}$) dentro de cada concentração de células viáveis testada (Figura 25), o que indica a habilidade do intercalante em diferenciar células viáveis e inviáveis de *Salmonella* spp.

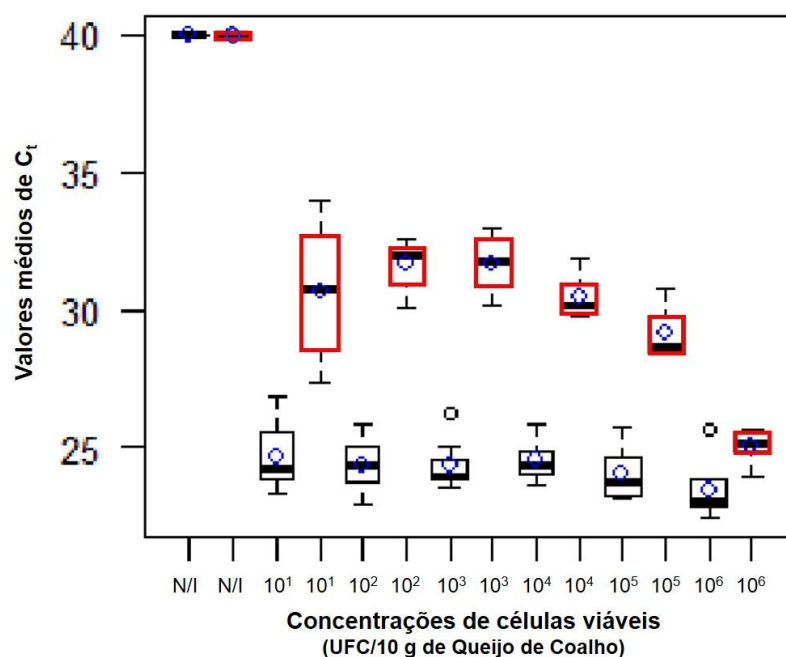


Figura 25. Valores médios de C_t das amostras tratadas e não tratadas com EMA (0 e 50 $\mu\text{g/mL}$) dentro de cada uma das concentrações de células viáveis de *Salmonella typhimurium* testadas. $\blacksquare$ = 0 $\mu\text{g/mL}$ de EMA; $\color{red}\square$ = 50 $\mu\text{g/mL}$ de EMA; N/I = não inoculadas. Teste de Dunnett ($p < 0,001$).

Entre as amostras não tratadas com EMA, foi observada diferença estatística ($p < 0,01$) somente entre as concentrações 10⁶ e 10¹ UFC/10 g de queijo (Figura 26). Não foi observada diferença estatística entre as demais concentrações não tratadas com o intercalante. A impossibilidade em diferenciar estatisticamente os valores

médios de C_t das amostras não tratadas com EMA se deve ao fato de as células inviáveis, presentes em todas as amostras na concentração de 10^6 UFC/10 g de queijo, também sofrerem amplificação durante a qPCR, uma vez que não há ação do EMA sobre o DNA das mesmas.

Os valores médios de C_t das amostras inoculadas com concentrações de células de 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC/10 g de queijo, tratadas com EMA (50 μ g/mL), foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$) (Figura 26). Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os valores médios de C_t das amostras inoculadas com 10^1 e 10^4 UFC/10 g ($p < 0,01$). A hipótese para o ocorrido pode ser explicada por falha na homogeneização manual da amostra inoculada com 10^1 UFC/10 g de queijo, uma vez que concentração de células é bastante baixa. Da mesma forma, não foi observada diferença estatística entre os valores médios de C_t das amostras inoculadas com 10^3 e 10^2 UFC/10 g de queijo ($p < 0,01$).

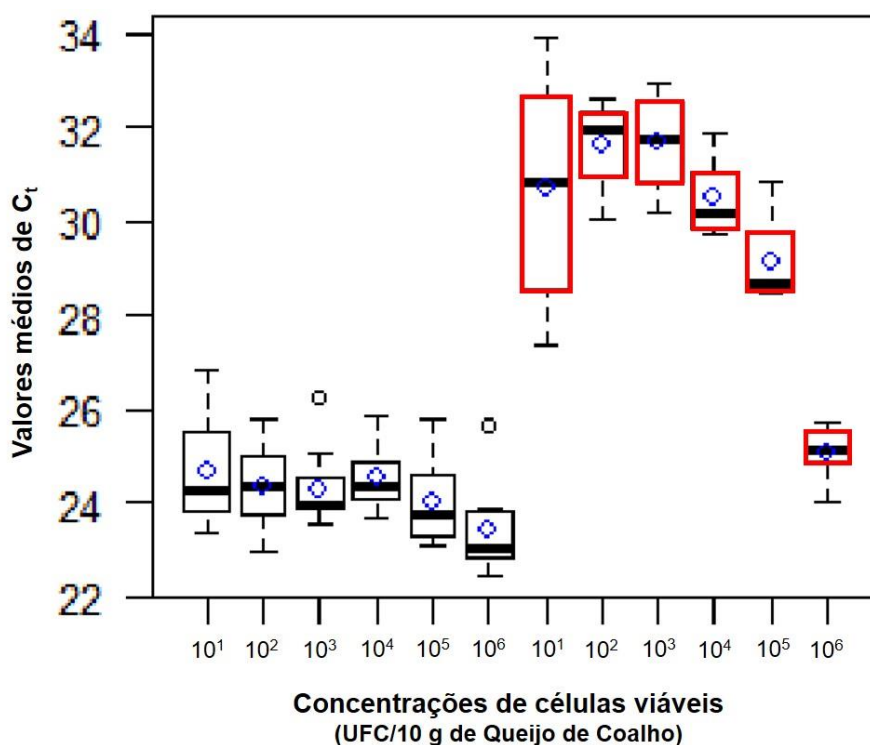


Figura 26. Valores médios de C_t obtidos na determinação do limite de detecção em amostras inoculadas com diferentes concentrações de células viáveis de *Salmonella typhimurium*, tratadas ou não com EMA (50 μ g/mL); $\blacksquare$ = 0 μ g/mL de EMA; $\color{red}\square$ = 50 μ g/mL de EMA; N/I = não inoculadas. Teste F ($p < 0,001$).

Assim, apesar da técnica de qPCR aliada ao uso do EMA ter sido capaz de detectar concentrações tão baixas de células viáveis de *S. typhimurium* quanto 10^1 UFC/10 g de Queijo de Coalho, somente é possível diferenciar estatisticamente

as médias dos valores de C_t em concentrações de células superiores a 10^3 UFC/10 g de queijo. Portanto, o valor de C_t considerado como limite para diferenciação entre amostras positivas e negativas neste estudo é 31,68.

Na Contagem Padrão em Placas, somente foi possível detectar a presença do patógeno nas amostras de Queijo de Coalho inoculadas com concentrações de células viáveis superiores a 10^3 UFC/10 g. Dessa forma, pode-se constatar a alta eficiência e especificidade do protocolo desenvolvido em detectar baixas quantidades de células viáveis de *S. typhimurium*, mesmo na presença de células inviáveis.

6 CONCLUSÕES

O protocolo estabelecido foi eficaz para identificação de células viáveis de *Salmonella* spp., tanto em culturas puras quanto em Queijo de Coalho, utilizando EMA combinado à técnica de PCR em Tempo Real. Entretanto, a diferenciação de células viáveis e inviáveis de *S. aureus* pelo uso do EMA em culturas puras e em Queijo de Coalho não foi eficiente. Portanto, não é possível realizar a detecção de células viáveis desses patógenos em *multiplex* em culturas puras e em Queijo de Coalho.

A técnica de qPCR aliada ao uso do EMA é capaz de detectar concentrações tão baixas de células viáveis de *S. typhimurium* quanto 10^1 UFC/10g de Queijo de Coalho. Contudo, somente é possível diferenciar estatisticamente as médias dos valores de C_t em concentrações de células superiores a 10^3 UFC/10 g de queijo. Portanto, o valor de C_t limite para diferenciação entre amostras positivas e negativas é 31,68.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. Bacterial Agents of Foodborne Illness. In: _____. **Food Microbiology**. 3.ed. Cambridge: RSC Publishing, 2008. 463 p. p.182-269.
- ALMEIDA, S. L.; PAIVA JÚNIOR, F. G.; GUERRA, J. R. F. Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista Interdisciplinar de Gestão Social**, v. 2, n. 2, p. 2317-2428, 2013.
- Applied Biosystems (2010). **TaqMan® Universal Master Mix Protocol**. Life Technologies Inc, Foster City, EUA.
- ARAÚJO, M. C. G.; SANTOS, R. A.; SILVA, C. P. A.; CIRILO, R. L.; CIRILO, R. L.; MARQUES, R. C. P. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de Currais Novos. **Holos**, v.4, p. 20-25, 2009.
- BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGEUIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em Queijo de Coalho produzidos no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de Junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 jul. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por alimentos. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em 17 dez. 2015.
- CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.
- CAWTHORN, D. M.; WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells using propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1178-1185, 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through the food - foodborne diseases act surveillance network, 10 U.S. sites, 2006-2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6418a4.htm?s_cid=mm6418a4_w>. Acesso em 4 ago. 2015.
- CHANG, B.; SUGIYAMA, K.; TAGURI, T.; AMEMURA-MAEKAWA, J.; KURA, F.; WATANABE, H. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/Real Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 147-153, 2009.

CHANG, B.; TAGURI, T.; SUGIYAMA, K.; AMEMURA-MAEKAWA, J.; KURA, F.; WATANABE, H. Comparison of erhidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 119-123, 2010.

CHEN, N. -T.; CHANG, C. -W. Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. **Journal of Applied Microbiology**, n. 109, p. 623-634, 2010.

DIAS, J. N.; FONTINELE, L. L.; MACHADO, S. M. O.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo Coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DORAK, M. T. **Real-time PCR**. 1 ed. Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006. 333p.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo Coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. -A. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. **Clinical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 40-63, 2011.

EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Salmonellae, Salmonellosis, and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2327-2343, 1992.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of the viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1-13, 2013.

EVÊNCIO-LUZ, L.; LIMA-FILHO, J. V.; EVÊNCIO-NETO, J. Occurrence of *Salmonella* spp. and coagulase-positive Staphylococci in raw eggs and Coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's northeast. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1463-1466, 2012.

FERNANDES, R. **Microbiology Handbook: Dairy Products**. 2 ed. Leatherhead: Leatherhead Food International Ltd, 2009. 173 p.

FITTIPALDI, M.; CODONY, F.; ADRADOS, B.; CAMPER, A. K.; MORATÓ, J. Viable Real- Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? **Microbial Ecology**, v. 61, p. 7-12, 2011.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential direction of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 276-289, 2012.

FITTIPALDI, M.; RODRIGUEZ, N. J. P.; CODONY, F.; ADRADOS, B.; PEÑUELA, G. A.; MORATÓ, J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 168, p. 228-232, 2010.

FLEKNA, G.; STEFANIC, P.; WAGNER, M.; SMULDERS, F. J. M.; MOZINA, S. S.; HEIN, I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria*

monocytogenes cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. **Research in Microbiology**, n. 158, p. 405-412, 2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global Dairy Sector: Status and Trends. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1522e/i1522e02.pdf>. Acesso em 10 mar. 2016.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 493-537, 2014.

GEDALANGA, P. B.; OLSON, B. H. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 587-596, 2009.

GRAVIER, D. A.; SAUNDERS, S. E.; TOPLIFF, C. L.; KELLING, C. L.; BARTELT-HUNT, S. L. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. **Journal of Virological Methods**, v. 164, p. 51-54, 2010.

HENNEKINNE, J. -A.; DE BUYSER, M. -L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 1-22, 2011.

IIBUCHI, R.; HARA-KUDO, Y.; HASEGAWA, A.; KUMAGAI, S. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. **Journal of Food Protection**, n8, p. 1506-1510, 2010.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

KOBAYASHI, H.; OETHINGER, M.; TUOHY, M. J.; HALL, G. S.; BAUER, T. W. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. **Letters in Applied Microbiology**, n. 48, p. 633-638, 2009.

KRAMER, M.; OBERMAJER, N.; MATIJASIC, B. B.; ROGELJ, I.; KMETEC, V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilized product by real-time PCR and by flow cytometry. **Applied in Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1137-1147, 2009.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; OLIVEIRA, F. E. M.; SOUSA, C. T. **Isolamento e identificação de patógenos em Queijo Coalho**. 1 ed. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 16 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. Cell Structure and Function in *Bacteria* and *Archaea*. In: _____. **Brock Biology of Microorganisms**. 13 ed. Benjamin Cummings, 2012. 1155p. p. 47-84.

MINAMI, J.; YOSHIDA, K.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 900-909, 2010.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective Removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1997-2004, 2006.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. -Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of FNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 310-320, 2006.

NOCKER, A.; SOSSA-FERNANDEZ, P.; BURR, M. D.; CAMPER, A. K. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5111-5117, 2007a.

NOCKER, A.; SSOSSA, K. E.; CAMPER, A. K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 2, p. 252-260, 2007b.

NOVGA, H. K.; DROMTORP, S. M.; NISSEN, H.; RUDI, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **Biotechniques**, v. 34, n. 4, p. 804-813, 2003.

PAN, Y.; BREIDT JR, F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. **Applied and Environmental microbiology**, v. 73, n. 24, p. 8028-8031, 2007.

PIKNOVÁ, L.; KACLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; POLEK, B.; KUČHTA, T. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time Polymerase Chain Reaction targeted to *fimC* gene. **Current Microbiology**, v. 50, p. 38-42, 2005.

R Core Team (2013). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RUDI, K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLK, A. L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1018-1024, 2005a.

RUDI, K.; NATERSTAD, K.; DROMTORP, S. M.; HOLO, H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 301-306, 2005b.

SÁ, J. F. O. **Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em Tempo Real**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

SAS Institute Inc. (2009). **SAS/STAT® User's guide: Statistics, Version 9.2**. SAS Institute, Cary, US.

SILVA, M. R.; PORTES, V. M.; MENIN, A.; ALVES, F. S. F. Doenças transmitidas pelo leite e sua importância em saúde pública. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, p. 3-18, 2007.

SHI, H.; XU, W.; LUO, Y.; CHEN, L.; LIANG, Z.; ZHOU, X.; HUANG, K. The effect of various environmental factors on the ethidium monoazide and quantitative PCR method to detect viable bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1194-1204, 2011.

SHIPLEY, G. L. An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M. T. **Real-time PCR**. 1 ed. Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006. 333p.

SHORTLE, D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. **Gene**, v. 22, p. 181-189, 1983.

SILVA, R. A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo Coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012.

SOEJIMA, T.; IIDA, K.; QIN, T.; TANIAI, H.; SEKI, M.; TAKADE, A.; YOSHIDA, S. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. **Micobiology and Immunology**, v. 51, n. 8, p. 763-775, 2007.

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.

SOEJIMA, T.; SCHLITT-DITTRICH, F.; YOSHIDA, S. Polymerase chain reaction amplifications length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. **Analytical Biochemistry**, v. 418, p. 37-43, 2011a.

SOEJIMA, T.; SCHLITT-DITTRICH, F.; YOSHIDA, S. Rapid detection of viable bacteria by nested polymerase chain reaction via long DNA amplification after ethidium monoazide treatment. **Analytical Biochemistry**, v. 418, p. 286-294, 2011b.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

THE European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v. 13, n. 12, p. 1-191, 2015.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1719-1728, 2009.

World Health Organization. The burden of foodborne diseases is substantial. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferginfoographics.pdf?ua=1>. Acesso em 27 dez. 2015.