



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAISSA CURTI BONFANTE

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Salmonella*  
spp E DOS GENES *eae* E *It* DE *Escherichia coli* EM  
HORTALIÇAS ORGÂNICAS**

RAISSA CURTI BONFANTE

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Salmonella*  
spp E DOS GENES *eae* E *It* DE *Escherichia coli* EM  
HORTALIÇAS ORGÂNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina  
Rocha Moreira de Oliveira

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B713p Bonfante, Raissa Curti.

PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp e dos genes *eae* e *It* de *Escherichia coli* em hortaliças orgânicas / Raissa Curti Bonfante. – Londrina, 2012.  
90 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Salmonelose – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Hortaliças – Microorganismos patogênicos – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

RAISSA CURTI BONFANTE

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Salmonella*  
spp E DOS GENES *eae* E *It* DE *Escherichia coli* EM  
HORTALIÇAS ORGÂNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina  
Rocha Moreira de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jane Martha Graton Mikcha  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 31 de maio de 2012.

*Dedico esta conquista,*

*À minha mãe **Maria Eleni** e ao meu pai **Valdir***

*Pelo amor, incentivo, orações e apoio em  
todas as fases da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. **Tereza Cristina R. M. de Oliveira** pela excelente orientação, paciência, compreensão e por compartilhar sua experiência.

A Profa. Dra. **Jacinta Sanchez Pelayo** pelas sugestões no exame de qualificação, pela doação das cepas de ETEC e EPEC e pelo aceite para participação da banca de defesa.

A Profa. Dra. **Jane Martha Graton Mikcha** pela disponibilidade e aceite para participação da banca da defesa.

A Profa. Dra. **Luciana Furlaneto-Maia** pela amizade, pela disponibilidade e pelas sugestões no exame de qualificação. Obrigada por me ingressar na microbiologia de alimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela atenção, competência e pelos conhecimentos compartilhados.

A minha mãe **Maria Eleni Curti**, ao meu pai **Valdir Moraes Bonfante** e a minha irmã **Mayra Curti Bonfante**, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e educação. Sem palavras para explicar o quanto são importantes na minha vida pessoal e profissional.

A toda minha família, em especial as minhas tias **Eunides Curti** e **Rosemeire Moraes Bonfante**, ao meu tio **Luiz Antônio Curti**, aos meus avós **Alcides Curti** e **Maria Ramazzoti Curti** e **Egídeo Bonfante** e **Carmem Moraes Bonfante**, e a minha bisavó **Sebastiana Moraes**, que com seus 102 anos continua sendo um exemplo de amor para toda a família.

Ao meu namorado **Fábio Vanso Castilho** pelo amor, compreensão, companheirismo, paciência e incentivo, por me dar forças para superar todos os momentos difíceis. Você é a minha maior inspiração de persistência e dedicação.

A amiga **Juliane Alves** pelo convívio no laboratório, pelos ensinamentos e pela ajuda. A **Natália Harumi Niguma**, que descobri ser minha prima depois de tanto tempo, pela amizade e pela companhia. A amiga **Erika Kushikawa Saeki** pela

enorme ajuda na parte experimental, pela amizade e pela companhia no laboratório.

As amigas **Tahis Baú**, **Marianne Shirai**, **Angélica Ishikawa**, **Danielle Honorato**, **Marcela Kobayashi**, **Maria Rita Alaniz Porto** e **Marines Corso** pela amizade, pelo incentivo e pelo carinho.

A amiga **Camila Vanso Castilho** por acreditar em mim, pelo carinho em todas as horas. A amiga **Thais Erance de Oliveira**, que mesmo longe sempre me deu muita força e acreditou em mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

E principalmente a **DEUS** pela saúde, conhecimento, proteção e por tudo que conquistei. Por me direcionar nos momentos de alegria, e principalmente nos momentos de aflição e tristeza. Obrigada por tudo!

*Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos  
e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida,  
esses são imprescindíveis.*

*(Bertolt Brecht)*



BONFANTE, Raissa Curti. **PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp e dos genes *eae* e *lt* de *Escherichia coli* em hortaliças orgânicas.** 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

Hortaliças orgânicas podem ser fontes de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* spp e *Escherichia coli* diarreiogênicas, que são causas frequentes de doenças de origem alimentar. O gene *invA* codifica as proteínas de invasão celular de *Salmonella* spp., a adesina intimina, codificada pelo gene *eae*, é a proteína responsável pela aderência íntima de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* enterohemorrágica, e *Escherichia coli* enterotoxigênica produtoras de toxina LT, codificada pelo gene *lt*, são as mais frequentemente isoladas em humanos. O objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio PCR multiplex para detecção simultânea de *Salmonella* e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2, *eae* e *lt* foram específicos e geraram produtos de amplificação de aproximadamente 119 pb, 218 pb e 384 pb para *Salmonella* spp., ETEC e EPEC, respectivamente. O volume final de reação foi de 20  $\mu$ L, contendo 4  $\mu$ L de DNA alvo, 4 mM de  $MgCl_2$ , 0,6 mM de dNTPs, 0,5 mM de StyinvaJHO2-R e StyinvaJHO2-F, 0,3 mM de LT-R e LT-F, 0,3 mM de *eae*-R e *eae*-F e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 95 °C por 5 min., seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 60 s, hibridação a 60 °C por 60 s, polimerização da sequência alvo a 72 °C por 60 s e polimerização da sequência alvo final a 72 °C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5% acrescidos de 0,02  $\mu$ L/mL de SYBR<sup>®</sup>Safe. A especificidade do ensaio foi de 100 % e foi testada com culturas puras de diferentes sorovares de *Salmonella* e de outras espécies bacterianas. O limite de detecção para cada uma das bactérias patogênicas testadas foi de 10<sup>4</sup> UFC/mL. A PCRm padronizada foi testada com 102 amostras de hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres de Londrina, Paraná. Paralelamente, essas mesmas 102 amostras foram avaliadas quanto a contaminação por *Salmonella* spp. e *E. coli* pelo método tradicional de cultura e placas Petrifilm<sup>™</sup>EC, respectivamente. *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das amostras analisadas tanto pela cultura quanto pela PCRm. Trinta e quatro amostras estavam contaminadas com *E. coli*, com contagens que variavam de 10<sup>2</sup> UFC/g a 8,0 x 10<sup>6</sup> UFC/g. Em uma das amostras positivas foi isolada *E. coli* com gene *lt* e em uma outra amostra *E. coli* com gene *eae*. A PCRm padronizada é uma alternativa para a detecção em hortaliças orgânicas de *Salmonella* spp. e dos genes *lt* e *eae* de *E. coli*. O ensaio pode ser utilizado como triagem para posterior identificação de outros fatores de virulência de *E. coli*.

**Palavras-chave:** PCR multiplex, hortaliças orgânicas, gastroenterites, fatores de virulência.

BONFANTE, Raissa Curti. **Multiplex PCR for detection of *Salmonella* spp and *eae* and *It* genes of *Escherichia coli* in organic vegetables.** 2012. 90f. Dissertation (Master in Food Science) – State University of Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

Organic vegetables can be sources of pathogenic microorganisms such as *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli*, that are frequent causes of foodborne illness. The *invA* gene encodes of proteins of cellular invasion of *Salmonella* spp, the adhesin intimin, encoded by the gene *eae*, is the protein responsible for intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli*, enterotoxigenic *Escherichia coli* producing LT toxin, encoded by *It* gene, are the most frequently isolated from humans. the objective of this study was to develop a multiplex PCR assay (mPCR) for simultaneous detection of *Salmonella* and *It* and *eae* genes of *E. coli* in organic vegetables. The pairs of primers Styinva-JHO-2, *eae* and *It* were specific and generated amplification products of approximately 119pb, 218 pb and 384 pb for *Salmonella* spp., ETEC and EPEC, respectively. The final volume of the reaction was 20  $\mu$ L, containing 4  $\mu$ l of DNA template, 4 mM of  $MgCl_2$ , 0,6 mM of dNTPs, 0.5 mM of StyinvaJHO2-R and StyinvaJHO2-F, 0.3 mM of *It*-R and *It*-F 0.3 mM of *eae*-R and *eae*-F, and 1U of *Taq* DNA polymerase. Amplification conditions were initial denaturation at 95 °C for 5 min., followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 60 s, annealing at 60 °C for 60 s, extention at 72 °C for 60 s and final extetion at 72 °C for 10 min. The amplification products were visualized on agarose gel 1.5% plus 0.02  $\mu$ L/mL of SYBR<sup>®</sup>safe. The specificity of the assay was 100% and it was tested using pure cultures of different *Salmonella* serovars and other bacterial species. The detection limit for each of the pathogenic bacteria tested was 10<sup>4</sup> CFU / mL. The developed mPCR was tested with 102 samples of organic vegetables purchased from local retail market of Londrina, Parana, Brazil. The samples were also analyzed for *Salmonella* spp. and *E. coli* using traditional culture method and Petrifilm<sup>™</sup>EC plates, respectively. *Salmonella* spp. was not detected in any sample analyzed by both culture method and the mPCR. Thirty-four samples were contaminated with *E. coli*, with counts ranging from 10<sup>2</sup> CFU/g to 8x10<sup>6</sup> CFU / g. In one of the positive samples was detected *E. coli* with *It* gene and in another sample *E. coli* with the *eae* gene. The developed mPCR is an alternative for detection of *Salmonella* spp and *It* and *eae* genes of *E. coli* from organic vegetables. The assay can be used as screening for subsequent identification of other virulence factors of *E. coli*.

**Keywords:** Multiplex PCR, organic vegetables, foodborne illness, virulence factors.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
3.1 Agricultura Orgânica	16
3.2 <i>Salmonella</i> spp. e Salmonelose	22
3.3 <i>Escherichia coli</i> Diarreio gênicas e Gastroenterite	24
3.4 Contaminação das Hortaliças	28
3.5 Métodos de Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i>	33
3.6 PCR para detecção de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> diarreio gênicas	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1 Isolados Bacterianos	37
4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
4.2.1 Extração do DNA	39
4.2.2 PCRm para detecção de <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica 2348/69 e <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica H10407	39
4.2.3 Análise dos produtos de amplificação	41
4.2.4 Análise da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores	41
4.2.5 Avaliação do limite de detecção do ensaio PCRm	41
4.3 Análise por PCRm de hortaliças folhosas artificialmente contaminada	42
4.4 Análise microbiológica e PCRm de hortaliças folhosas artificialmente e naturalmente contaminadas	42
4.4.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> pelo método microbiológico convencional	43
4.4.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e dos genes <i>eae</i> e <i>It</i> por PCRm	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>

<b>5.1 PCR multiplex para detecção de Salmonella spp. e dos genes eae e <i>lt</i> de <i>Escherichia coli</i> em hortaliças orgânicas</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Análise de hortaliças folhosas naturalmente contaminadas pela técnica convencional</b>	<b>61</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças veiculadas por água e alimentos (DVA) constituem um importante problema de saúde pública (LEITE; WAISSMANN, 2006), sendo responsáveis pela maior parte dos surtos de gastroenterite (SILVA *et al.*, 2004). Estratégias que permitam o seu controle e a oferta de produtos inócuos tem sido uma preocupação constante tanto dos órgãos governamentais quanto da indústria alimentícia (TESSARI *et al.*, 2008).

A busca por alimentos mais saudáveis constitui uma realidade em todo mundo, trazendo mudanças nos hábitos alimentares da população. O consumo de frutas e hortaliças tem sido estimulado por campanhas, pelos grandes benefícios que trazem à saúde. Por outro lado, as autoridades sanitárias de diferentes países relacionam o consumo de frutas e hortaliças contaminadas como um dos veículos na ocorrência crescente de surtos de doenças de origem alimentar (ALVES *et al.*, 2007). Este fato é preocupante, uma vez que, até alguns anos atrás, produtos de origem vegetal raramente eram incriminados como veículos de patógenos. Ênfase muito maior era dada aos problemas de contaminação química dos produtos agrícolas (principalmente por resíduos de defensivos) e seus efeitos, agudos ou crônicos, na saúde do consumidor (LEITÃO, 2006).

Recentemente, a consciência com a proteção do meio ambiente, com a segurança alimentar e com a saúde e bem-estar aumentou a produção de produtos orgânicos. Em todo o mundo, há um interesse crescente na relação entre o alimento, a nutrição e a saúde (LAIRON, 2009). No entanto, o mercado de produtos orgânicos apresenta algumas dificuldades como a baixa escala de produção e, ainda, a necessidade do pagamento da certificação, fiscalização e assistência técnica que, diferentemente do sistema convencional, representam custos adicionais aos produtores (SANTOS; MONTEIRO, 2004).

De acordo com a *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM, 2011), a demanda por produtos orgânicos na Europa cresce a taxa de 40% ao ano. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, nos próximos anos, o mercado pode crescer entre 61 a 94 bilhões de dólares nos países com mercados orgânicos

certificados, ou entre 3,5 a 5% no mercado global de alimentos (Mercado de Orgânicos, 2011).

Apesar da importância do estudo da segurança de alimentos orgânicos para a saúde humana, um número limitado de estudos foi realizado para averiguar os riscos microbiológicos que estes alimentos oferecem (MAGKOS *et al.*, 2003; LAIRON, 2009; SEOW *et al.*, 2012). As informações sobre a produção da agricultura orgânica no Brasil ainda são relativamente escassas e não existe controle sistemático dos dados de produção por nenhum órgão federal (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos é pouco conhecido no Brasil. Apenas poucos estados dispõem de Programas de Vigilância e levantamento de dados epidemiológicos sobre estes surtos (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). Entre 2000 e 2011, *Salmonella* spp. foi responsável por 42,3% e *E. coli* por 10,5% dos surtos que ocorreram no Brasil, dos quais foi possível a identificação do micro-organismo envolvido (SVS, 2011). Estes números não refletem a realidade, visto que muitos casos e surtos não são notificados. Em relação à pesquisa dos grupos patogênicos de *E. coli* envolvidos no surtos ou casos esporádicos, os dados são muito escassos.

A patogenicidade de um micro-organismo está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). O gene *invA*, que codifica para as proteínas de invasão celular, é o gene alvo utilizado com maior frequência para a detecção de *Salmonella* spp. pela técnica de PCR (DARWIN; MILLER, 1999; WANG *et al.*, 2009). A adesina íntima, codificada pelo gene *eae* é a proteína responsável pela aderência íntima à membrana do enterócito e pela supressão das microvilosidades por *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* enterohemorrágica (NATARO e KAPER, 1998; CLARKE *et al.*, 2003; BLANCO, 2006; GÓMEZ-DUARTE, 2009). *Escherichia coli* enterotoxigênica produtoras de toxina LT são mais frequentemente isoladas em humanos e apesar de estar relacionada com a baixa prevalência de fatores de colonização pode levar a desidratação devido à diarreia aguda (QUADRI *et al.*, 2005).

Segundo a Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, entre 2000 e 2011, as frutas e hortaliças foram responsáveis por

aproximadamente 12,5% dos surtos de origem alimentar (SVS, 2011). Recentes surtos de origem alimentar em todo o mundo, levaram ao reconhecimento de vegetais como veículos emergentes de doenças transmitidas por alimentos (SEOW *et al.*, 2012).

A PCR multiplex (PCRm), que é uma variação da PCR convencional, pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, sequências alvo de diferentes micro-organismos patogênicos em uma única reação, com grande potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (GANDRA *et al.*, 2008). Diversos ensaios de PCR para detecção individual ou simultânea de *Salmonella* spp., de *E. coli* diarreio gênicas e outros patógenos em frutas e hortaliças já foram padronizados (OLIVEIRA *et al.*, 2003; SHELTO *et al.*, 2006; ELIZAQUÍVEL; AZNAR, 2008; GALLEGOS-ROBLES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; PUI *et al.*, 2011; SANT'ANA, *et al.*, 2011; DIANA, PUI, SON, 2012; ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; XU *et al.*, 2012).

Diante da importância da detecção de bactérias patogênicas na cadeia de produção desses alimentos, bem como para o diagnóstico de gastroenterites. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma nova proposta de PCR multiplex (PCRm) para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um ensaio PCRm para detecção de gênero *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

Definir as condições da PCRm que permitam a detecção simultânea de *Salmonella* e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em culturas puras;

Determinar a sensibilidade e a especificidade da PCRm padronizada;

Avaliar o ensaio PCRm padronizado com amostras de hortaliças orgânicas contaminadas artificialmente e naturalmente.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Agricultura Orgânica

A agricultura orgânica é o sistema de produção que exclui o uso de fertilizantes sintéticos de alta solubilidade, agrotóxicos, reguladores de crescimento e aditivos para a alimentação animal. Baseia-se no uso de esterco animal, rotação de culturas, adubação verde, compostagem e controle biológico de pragas e doenças. A agricultura orgânica busca manter a estrutura e produtividade do solo, trabalhando em harmonia com a natureza (EHLERS, 2011).

O aumento da importância de produtos orgânicos tem acarretado uma preocupação crescente dos governos em regulamentar seus mercados para a comercialização de tais produtos. No entanto, o Estado deveria ser responsável pela fiscalização eficaz, de modo a evitar o desrespeito às regras de produção estabelecidas, mas o que se observa hoje é uma tendência de “delegação de poderes” no que tange a regulamentação da produção orgânica. Nesse cenário surgem as certificadoras, responsáveis pelo controle e pela efetivação das normas de produção orgânica (STRINGHETA, 2003). No caso brasileiro, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabeleceu, através da Instrução Normativa (IN) 007, de 17 de maio de 1999, *"as normas de produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e de certificação da qualidade para os produtos orgânicos de origem vegetal e animal"* (BRASIL, 1999). Segundo a IN- 007/99, *"os produtos de origem vegetal ou animal, processados ou in natura, para serem reconhecidos como orgânicos devem ser certificados por pessoa jurídica, sem fins lucrativos, com sede no território nacional, credenciada no Órgão Colegiado Nacional (...)".* A denominação "produto orgânico" deverá ser mencionada no rótulo e deve constar da embalagem um "selo de qualidade" da entidade certificadora credenciada (BRASIL, 1999).

De acordo com a Lei 10.831 de 23 dezembro de 2003, considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e

socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

De acordo com a Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008 (BRASIL, 2008), a agricultura orgânica tem como objetivo a manutenção das áreas de preservação permanente; a atenuação da pressão antrópica sobre os ecossistemas naturais e modificados; e a proteção, a conservação e o uso racional dos recursos naturais; o melhoramento genético, visando à adaptabilidade às condições ambientais locais; a manutenção e a recuperação de variedades locais, tradicionais ou crioulas, ameaçadas pela erosão genética; a promoção e a manutenção do equilíbrio do sistema de produção como estratégia de promover a sanidade dos animais e vegetais; a interação da produção animal e vegetal; e a valorização dos aspectos culturais e a regionalização da produção.

A agricultura orgânica no mundo está se desenvolvendo rapidamente, sendo praticada em mais de 130 países. O IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movements*) é uma entidade que desde o ano de 2000 publica anualmente uma estatística mundial referente a produção orgânica. Segundo dados recentes publicados pela IFOAM no estudo "*The world of organic agriculture: 2009*" a área com produtos orgânicos no mundo é de mais de 32,2 milhões de hectares em mais de 1,2 milhões de propriedades convertidas ao cultivo. Comparando com os dados de 2006, houve um incremento de mais de 1,5 milhões de hectares, sendo que a América Latina contribuiu com 28% desse incremento (WILLER; KLICHER, 2009).

No entanto, se analisarmos as estatísticas referentes à agricultura orgânica mundial, disponibilizados pela IFOAM, em 2001 o Brasil possuía 275.576 hectares certificados. Em 2003, eram 803 mil hectares e, em 2007, passou para 887 mil hectares (o triplo da área ocupada em 2001). Embora o

Brasil ocupa o 6º lugar na área de produção orgânica do mundo, detém apenas 0,3% da produção orgânica mundial. O número de produtores é estimado em cerca de 19 mil, sendo que 90% são pequenos produtores. O crescimento da produção orgânica é estimado em 30% a 50% anualmente (ARBOS, 2009).

Estima-se que a área cultivada sob manejo orgânico no Brasil na safra de 2007 foi de aproximadamente 887 mil hectares, o triplo da área ocupada em 2001 (WILLER; YUSSEFI, 2007). A maior parte da produção orgânica brasileira (80%) encontra-se nas regiões do Sul e Sudeste (BUAINAIN; BATALHA, 2007), sendo que a produção orgânica no Paraná destaca-se nacionalmente, com crescimento superior a 1200% nas últimas 8 safras. As principais culturas exploradas são a de soja, hortaliças, frutas e cana de açúcar (HAMERSCHMIDT, 2005). Em torno de 85% da produção orgânica brasileira é exportada, sobretudo para a Europa, Estados Unidos e Japão. O restante (15%) é distribuído no mercado interno (DAROLT, 2003; CAMARGO FILHO *et al.*, 2004).

Segundo a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (SEAB) do Paraná e do Instituto EMATER do Paraná, o valor bruto da produção orgânica do Estado do Paraná nas safras 2007/2008 foi de 100 milhões de reais (Tabela 1). O mercado mundial de produtos orgânicos cresceu na década de 90 cerca de 10% ao ano, mas na virada do século houve uma aceleração vertiginosa, com estimativas de crescimento em torno de 40 a 50%, em termos de volume de produtos comercializados (ARBOS, 2009). O mercado de orgânicos movimentou em 2007-2008 cerca de US\$ 40 bilhões (R\$ 89,2 bilhões) ao ano, no mundo (LUNARDON, 2009).

Tabela 1 - Produção Orgânica do Paraná, Safra 2007/2008

CULTURAS	Área(há)	Produção(t)	Nº produtores
SOJA	3.730,40	7.980,20	456
MILHO	1.023,90	5.431,50	471
TRIGO	141,20	281,80	24
FEIJÃO	577,80	839,10	369
ARROZ	1.107,80	6.029,48	214
CAFÉ	528,86	1.809,50	59
MANDIOCA	1.244,32	26.904,00	507
FRUTAS	1.115,82	12.964,20	647
HORTALIÇAS	1.284,54	26.504,80	1.320
PL. MEDICINAIS	389,27	1.534,42	346
CANA-AÇÚCAR	514,50	25.132,00	230
ERVA MATE	1.100,00	8.800,00	65
FUMO	40,00	66,00	20
GIRASSOL	2,00	6,00	3
AMENDOIM	3,10	4,88	5
ALGODÃO	18,00	36,00	15
TOTAL	12.821,51	124.328,88	4.751

Valor bruto da produção: R\$ 100.000.000,00 (Cem milhões de reais)<sup>a</sup>.

**Fonte:SEAB / DERAL / INSTITUTO EMATER**

<sup>a</sup>Principais regiões produtoras: Curitiba e Litoral: hortaliças, frutas, plantas medicinais, feijão, milho, arroz irrigado. Francisco Beltrão, Cascavel e Toledo: soja, trigo, cana de açúcar. Londrina, Maringá, Cornélio Procópio, Santo A. da Platina, Apucarana: café, cana de açúcar, frutas, hortaliças. Umuarama, Paranavaí, Campo Mourão: mandioca, frutas, algodão. Irati, Ponta Grossa, União da Vitória e Guarapuava: milho, feijão, soja, hortaliças, plantas medicinais.

O mercado interno para o produto orgânico ainda é pequeno, com predominância de hortifrutigranjeiros, todavia o potencial de crescimento é enorme. As estatísticas mundiais sobre o setor de alimentos orgânicos ainda são insuficientes, o que dificulta a obtenção de números mais precisos sobre o tamanho deste mercado. No entanto, há uma clara tendência de aumento do crescimento das demandas de mercado já que o consumidor está optando por pagar um pouco mais por um produto diferenciado, e com valor agregado (SEBRAE/NA, 2011b).

A agricultura orgânica utiliza de alguns canais de distribuição para a comercialização dos seus produtos e em alguns deles não existe a presença de intermediários, e o próprio produtor é quem distribui seus produtos. Outro mecanismo de comercialização é a venda por meio das feiras de produtos orgânicos, que estimulam o desenvolvimento dos mercados locais, constituindo-se em uma forma de apoiar produtores ainda não certificados. Embora significativa, a participação do varejo supermercadista na venda de tais produtos tem caído ultimamente, em benefício da participação da comercialização por meio de feiras e associações. Isso se deve ao fato de que os pequenos e médios produtores representam grande parte do total de produtores orgânicos, atuando basicamente no mercado interno (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

A competitividade da cadeia produtiva de produtos orgânicos fundamenta-se em estratégias de diferenciação de produtos. Essa estratégia tem como princípio a geração de produtos diferenciados e com alto valor agregado que possam atender a nichos de mercado cada vez mais segmentados e específicos. Porém, as características intrínsecas dos produtos orgânicos, que não podem ser observadas com facilidade no momento da compra, justificam a necessidade de monitoramento pelas empresas certificadoras. Estas empresas têm sido responsáveis não somente pela garantia dos produtos ofertados, no que tange às normas e procedimentos para o cultivo orgânico, como também pela orientação de produtores e consumidores (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

A certificação de produtos orgânicos visa conquistar maior credibilidade dos consumidores e conferir maior transparência às práticas e aos princípios utilizados na produção orgânica. A certificação é outorgada por diferentes instituições no país, as quais possuem normas específicas para a concessão do seu selo de garantia (CAMPANHOLA e VALARINI, 2001; GIORDANO e KRUGLIANSKAS, 2004). Não há, segundo a FAO, uma regulamentação sobre produtos orgânicos que possa ser aplicada mundialmente. As percepções de como se definir e certificar produtos orgânicos, em diferentes associações, países e indústrias, podem diferir muito entre si. Dessa forma, produtos orgânicos de marcas diferentes podem ter padrões bastante diferenciados para definir um mesmo produto (FAO, 2004).

No caso de produtos destinados à exportação, é preciso que a entidade certificadora seja devidamente registrada junto IFOAM (ARBOS, 2009). Os exemplos de órgãos certificadores no Brasil são: Instituto Biodinâmico (IBD), avaliado pela IFOAM e cujo selo é aceito em mercados internacionais e a Associação de Agricultura Orgânica (AAO), cujo selo é aceito apenas nacionalmente, mas existem outras certificadoras no Brasil (GIORDANO e KRUGLIANSKAS, 2004).

Fundamentalmente, o sistema de certificação julga se um processo de produção está em conformidade com as regras estabelecidas pela normalização. Após a realização da certificação os agentes serão auditados a cada período de tempo (em geral a cada seis meses). Esta auditoria pode ser realizada por delegação do certificador ou pela própria certificadora. São feitas *in loco*, por auditores que seguem um roteiro determinado de atuação. Na produção rural as verificações englobam as operações de campo, as instalações, todos os insumos e os registros realizados. Assim, o processo é feito de forma contínua ao longo do tempo por meio de um sistema permanente de auditoria (GIORDANO e KRUGLIANSKAS, 2004). Os custos de emissão do certificado orgânico, no caso das certificadoras nacionais, variam de 0,5% a 2% do valor faturado para a mercadoria e cobram-se tantas vezes quantas sejam as remessas de produto que necessitem de certificação, o caso de exportação. Para o mercado interno, o valor é cobrado pelo total de produto certificado vendido pela empresa, não sendo necessário emitir certificados específicos para cada carga. No caso das certificadoras internacionais, os custos de certificação são um pouco maiores, variando entre 2% e 5% do faturamento (CAMARGO FILHO *et al.*, 2004).

Todas as unidades de produção orgânica devem dispor de Plano de Manejo Orgânico e este deve contemplar (BRASIL, 2008): histórico de utilização da área; manutenção ou incremento da biodiversidade; manejo dos resíduos; conservação do solo e da água; manejos da produção vegetal, tais como manejo fitossanitário, material de propagação, instalações e nutrição; procedimentos para pós-produção, envase, armazenamento, processamento, transporte e comercialização; medidas para prevenção e mitigação de riscos de contaminação externa, inclusive OGM e derivados; procedimentos que contemplem a aplicação das boas práticas de produção; inter-relações

ambientais, econômicas e sociais; ocupação da unidade de produção considerando os aspectos ambientais, geomorfológicos, de eficiência energética, bioclimatológicos; ações que visem evitar contaminações internas e externas, tais como medidas de proteção em relação às fontes de contaminantes para áreas limítrofes com unidades de produção convencionais; controle da qualidade da água, dentro da unidade de produção, por meio de análises para verificação da contaminação química e microbiológica, que deverá ocorrer a critério do Organismo de Avaliação da Conformidade (OAC) ou da Organização de Controle Social (OCS) em que se insere o agricultor familiar em venda direta.

### 3.2 *Salmonella* spp. e Salmonelose

O gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. bongori* e *S. enterica*, dividida em seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Em 2004, foi identificada *Salmonella subterranea* isolada na região de Oak Ridge, EUA (SU; CHIU, 2007). Conforme a sequência de DNA ribossomal, essa bactéria apresentou 96,4% de similaridade com *Salmonella bongori* e por isso, ainda não há um consenso se é uma nova espécie (SHELOBOLINA *et al.*, 2004).

As subespécies de *S. enterica* estão classificadas em sorovares, determinados de acordo com a variabilidade dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares de virulência (Vi), presentes na superfície bacteriana (GALDINO, 2010). Até o momento, foram identificados mais de 2600 sorovares, a maioria pertencente à espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010).

Embora todos os sorovares de *Salmonella* sejam considerados patógenos em potencial, aproximadamente 200 são responsáveis por infecção em seres humanos e animais. Poucos sorovares são adaptados a determinados hospedeiros causando doenças específicas. Os sorovares estritamente adaptados ao homem são *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Sendai*, responsáveis pelas febres entéricas, como a febre tifóide. *S. Dublin* causa doença em bovinos, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves. Outros sorovares

denominados de ubiqüitários infectam tanto o homem como os animais, e são referidos comumente como não tifóides causando principalmente gastroenterites. Dentre estes temos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* descritos como os agentes mais importantes da salmonelose em humanos em vários países (FERNANDES *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009).

Espécies de *Salmonella* são patógenos intracelulares que podem causar diferentes manifestações de doença, genericamente denominada salmonelose e com distribuição cosmopolita (CASTILLA, 2003). A susceptibilidade à salmonelose difere de pessoa a pessoa, sendo mais severa em crianças e idosos. Salmonelose em humanos pode causar gastroenterite autolimitada com sintomas brandos a moderados incluindo náusea, vômito, febre, dor abdominal e diarréia. Sintomas clínicos mais severos, podem ocorrer em casos de bacteremia ou febre entérica (tifóide), o qual é caracterizado por cefaléia severa, febre alta, porém com ausência de diarréia (MALORNY *et al.*, 2009). A maioria das infecções são gastroenterites que ocorrem sem a necessidade de hospitalizações. Geralmente, o período de incubação 6 a 72 horas (h), com média de 12 a 36 h e duração de 1 a 4 dias. (CHEN *et al.*, 2010). A gastroenterite por *Salmonella* spp. é caracterizada por dor abdominal, náuseas, vômitos e às vezes febre, sendo sintomas normalmente leves e as infecções autolimitadas (MALORNY *et al.*, 2009; EFSA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, muitos casos de surtos de doenças veiculadas por água e alimentos (DVA) não são reportados e as dimensões do problema são desconhecidas (WHO, 2007). Aproximadamente 40 mil casos de salmoneloses são reportados a cada ano nos Estados Unidos e os sorovares mais comumente encontrados nas infecções humanas são *Enteritidis* e *Typhimurium*. Na União Européia, mais de 100.000 casos de salmonelose humana são reportados por ano. E somente em 2009, foram confirmados 108.614 casos de salmoneloses (EFSA, 2011).

O principal reservatório de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais domésticos ou selvagens e humanos. Infecções em humanos são associadas, principalmente, a alimentos de origem animal (SAEKI, 2011). No entanto, alimentos de origem vegetal foram associados a surtos de salmonelose que ocorreram nos USA no período de 2006 a 2011 (CDC, 2011).



A maioria dos fatores de virulência da *Salmonella* spp. é codificada por genes agrupados em ilhas de patogenicidade (IP) chamadas de *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI) (VIEIRA, 2009). Atualmente, o gênero *Salmonella* possui 17 ilhas diferentes, sendo as SPI-1 e SPI-2 as mais estudadas. Para a patogenicidade da *Salmonella* spp., a invasão é um fator de importante influência na virulência. O gene *invA* que codifica para as proteínas de invasão celular está presente na ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) e é o gene alvo utilizado com maior frequência para a detecção desta bactéria pela técnica de PCR (DARWIN; MILLER, 1999; WANG *et al.*, 2009). A sequência desse gene cromossomal é única para *Salmonella*, e está, possivelmente, presente em todos os sorovares (GÁLÁN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992; OLAH; SHERWOOD; LOGUE, 2005).

### **3.3 *Escherichia coli* Diarreio gênicas e Gastroenterite**

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 h a 35 °C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (SILVA *et al.*, 2007). O grupo dos coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5 – 45,5°C, com produção de gás. Neste grupo se enquadra a *Escherichia coli*, um importante indicador de condições higiênico-sanitárias inadequadas de processamento.

*E. coli* é a espécie predominante entre as diversas bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, que fazem parte da microbiota do trato intestinal do homem e dos animais de sangue quente (TORTORA, 2005). Esta bactéria ainda é encontrada na água, no solo, nos vegetais e alimentos de origem animal. Sua ocorrência em alimentos é avaliada sob dois aspectos: (1) a sua presença em alimento *in natura* indica uma contaminação de origem fecal, e a sua presença em alimentos processados, condições higiênicas insatisfatórias de produção; (2) outro aspecto a ser considerado é que algumas

cepas podem causar infecções gastrointestinais no homem e animais (FENG; WEAGANT, 2002).

Os fatores de virulência, os distintos sorotipos, os mecanismos de patogenicidade, as manifestações clínicas e a epidemiologia da doença dividem *Escherichia coli* em seis grupos diarreio gênicos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* com aderência difusa (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004; GOMEZ-DUARTE, 2009).

Em 1944, Kauffman propôs um esquema para a classificação sorológica de *E. coli* que é usada até hoje de forma modificada. De acordo com o esquema de Kauffman modificado, *E. coli* são sorotipadas com base nos antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (NATARO; KAPER, 1998; BASTOS, 2009). Uma combinação específica de antígenos O e H define o sorotipo de uma *E. coli*. Assim pode-se associar um quadro clínico com um sorotipo específico, pois são marcadores cromossômicos. No entanto, geralmente não são os antígenos sorológicos que conferem virulência (NATARO; KAPER, 1988). A classificação dos patotipos de *E. coli* leva em consideração o sorotipo e os fatores de virulência, porém nem sempre é possível caracterizar uma cepa baseado nessas características, pois a patogenicidade de uma bactéria pode ser transmitida geneticamente entre as cepas através de plasmídeos, fagos e ilhas de patogenicidade. Por isso, se faz necessário o uso de técnicas mais sofisticadas e precisas na diferenciação dos patotipos de *E. coli*, sendo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a mais utilizada nas últimas décadas (MENG *et al.*, 2001).

ETEC é responsável por diarreia infantil em países em desenvolvimento e por diarreia em adultos que estão viajando em países em desenvolvimento e industrializados. A contaminação fecal de água e alimentos é a principal razão da alta incidência desta doença em países em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, ETEC é a segunda causa mais comum de diarreia, depois do rotavírus, em crianças maiores de 5 anos (RIVERA, 2010). Os sintomas são semelhantes aos da cólera e afetam o intestino delgado provocando cólicas, vômitos, febre, diarreia

profusa e aquosa, sem sangue, podendo ocorrer desidratação e em casos graves choque hipovolêmico. A dose infectante é alta ( $10^8$  a  $10^{10}$  micro-organismos por mL ou g), o período de incubação varia de 8 a mais de 40 horas (média de 26 h), a duração da doença é curta e geralmente é auto-limitada (QUADRI *et al.*, 2005).

EPEC coloniza o intestino delgado por meio de fatores de colonização (geralmente adesinas) e produzem uma ou duas toxinas, induzindo a liberação de fluido intestinal. As toxinas produzidas são a termo-estável (ST) e a termo-lábil (LT), codificadas por plasmídeo (KAPER, 2004; QUADRI *et al.*, 2005). A toxina ST é uma proteína de 5KDa que pode resistir à uma temperatura de 100 °C por 30 min. Os dois tipos, STI e STII, apresentam diferenças biológicas e químicas (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, 2004).

A toxina LT é inativada por aquecimento a 100 °C por 30 min e é similar à toxina da cólera, com atividade de adenilato ciclase, que causa bloqueio das funções intestinais. É uma proteína de aproximadamente 80KDa, composta por 5 subunidades B, arranjadas em forma de anel e responsáveis pela ligação da toxina aos receptores das células intestinais, e uma subunidade A, que é responsável pela atividade enzimática da toxina. A subunidade A promove a ADPribosilação da proteína reguladora de adenilato ciclase de enterócitos, o que resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP), com consequente aumento na secreção de íons cloro. Esse desequilíbrio iônico reverte o fluxo normal de líquidos através do epitélio intestinal, o que resulta em perda de água e o quadro típico da diarreia (NATARO e KAPER, 1998; QUADRI *et al.*, 2005). Existem dois tipos de toxinas LT, LT-I que é expressa por cepas de EPEC patogênicas para seres humanos e animais, e LT-II que é encontrada principalmente em isolados de *E. coli* de origem animal e raramente em humanos (NATARO e KAPER, 1998).

As proporções relativas de EPEC produtora de somente uma das toxinas ou de LT e ST parece variar de uma área geográfica para outra. EPEC produtoras de toxina LT são mais frequentemente isoladas em humanos e apesar de estar relacionada com a baixa prevalência de fatores de colonização pode levar a desidratação devido à diarreia aguda (QUADRI *et al.*, 2005).

A prevalência de diarreia infantil por EPEC em países em desenvolvimento é alta, mas a frequência de casos em países industrializados

está aumentando (GÓMEZ-DUARTE, 2009). EPEC é uma importante causa de mortalidade infantil, no Brasil é responsável por aproximadamente 30% dos casos de diarreia em crianças de classe de baixa renda (BLANCO, 2006).

A transmissão ocorre principalmente por água e alimentos. O sítio de infecção é o intestino delgado, ocasionando má absorção de nutrientes e consequente diarreia com abundante quantidade de muco e pouco sangue, febre e vômito. O aspecto clínico da doença varia de uma diarreia limitada a uma forte síndrome de enterite crônica (NATARO e LEVINE, 1994; TORRES *et al.*, 2005; STELLA, 2009).

A lesão histológica que EPEC causa no epitélio intestinal recebe a designação de *attaching/effacing* ou lesão A/E, que ocorre também em EHEC. A lesão A/E envolve o gene *eae*, que está localizado na ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*). A adesina intimina, codificada pelo gene *eae* é uma proteína de cerca de 94KDa, presente na membrana externa da bactéria, responsável pela aderência íntima à membrana do enterócito e pela supressão das microvilosidades (NATARO e KAPER, 1998; CLARKE *et al.*, 2003; BLANCO, 2006; GÓMEZ-DUARTE, 2009).

Kaper (1996) denominou de EPEC típica aqueles isolados que apresentam gene *eae* e plasmídeo EAF (*adherence factor plasmid*) e de EPEC atípica aqueles isolados que apresentam gene *eae*, mas não contém o plasmídeo EAF. Esse plasmídeo codifica a produção do pili BFP (*bundle-forming pili*), que produz a característica de aderência localizada.

O gene *eae* é essencial para a virulência de EPEC, mas outros fatores de virulência são necessários para a instalação da doença. A característica mais notável da epidemiologia da infecção por EPEC é a distribuição etária. A infecção ocorre basicamente em crianças menores de 2 anos e em adultos pode ocorrer diarreia se o inóculo for elevado ( $10^8$ - $10^{10}$  micro-organismos por mL ou g). A dose infectante em crianças não é conhecida, mas presume-se ser muito mais baixa. A razão para a resistência relativa dos adultos e crianças mais velhas não é conhecida, mas a perda de receptores específicos com a idade é uma possibilidade (NATARO e KAPER, 1998).

Isolados de *E. coli* que expressam uma ou mais toxinas Shiga (Stx) formam o grupo de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC). Não está claro, no entanto, se a mera presença de genes que codificam Stx conferem patogenicidade na ausência de outros fatores de virulência (FAROOQ *et al.*, 2009). O termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) foi descrito para designar isolados que causam colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítico-urêmica (SHU), que expressam o gene Stx, causam lesões A/E e possuem o gene que codifica a hemolisina, presente no plasmídeo 60 MDa das EHEC. Assim, EHEC é considerada um subconjunto de STEC (NATARO; KAPER, 1998; STELLA *et al.*, 2009). A determinação da presença dos genes que codificam as toxinas Stx bem como o BFP é essencial para a diferenciação de isolados de EHEC e EPEC.

As respostas celulares que conduzem à lesão A/E devido a EHEC não têm sido estudadas tão completamente quanto as de EPEC. Curiosamente uma cepa de EHEC *eae* negativa foi capaz de aumentar a concentração de cálcio intracelular sem a lesão A/E, estes resultados sugerem que existem algumas diferenças entre a infecção por EHEC e EPEC (NATARO; KAPER, 1998). A infecção por EHEC resulta na formação de lesões A/E semelhantes às aquelas observadas por isolados de EPEC típicas, porém em regiões diferentes do intestino (CLARKE *et al.*, 2003). O receptor de ligação da intimina pode variar entre os sorotipos, e essa hipótese poderia explicar o fato de que EPEC é um agente patogênico do intestino delgado, enquanto EHEC é um patógeno do intestino grosso (NATARO; KAPER, 1998).

### **3.4 Contaminação das Hortaliças**

Um dos pontos mais questionados pelos críticos da agricultura orgânica é a contaminação microbiológica do produto agrícola causada pelo uso de dejetos de animais (DAROLT, 2003). A utilização de adubo orgânico tratado e não tratado como fonte de fertilizante é comum na agricultura orgânica e convencional. Embora os riscos potenciais sejam iguais, a agricultura convencional utiliza uma variedade de fertilizantes sintéticos

associado ao adubo orgânico, diminuindo a quantidade de adubação. A agricultura orgânica utiliza o adubo orgânico como única fonte de nutrientes. Assim, a importância do adubo orgânico como fonte alternativa de nutrientes é maior na produção orgânica do que nos sistemas convencionais (MAGKOS *et al.*, 2003).

Condições sanitárias desfavoráveis nas áreas rurais e urbanas favorecem essa contaminação, transformando os vegetais em veículos de transmissão de patógenos (RODRIGUES, 2007). A contaminação pode ocorrer resultante da utilização de água de irrigação ou adubos inadequados, na colheita, no transporte, na manipulação nos pontos de venda, as sucessivas manipulações aumentam as chances de contaminação (ABREU *et al.*, 2010).

Todos os alimentos devem ser produzidos seguindo práticas que resultem em produtos seguros para serem consumidos. No entanto, algumas questões têm sido levantadas a respeito da possibilidade de um risco aumentado de contaminação microbológica e parasitária nos alimentos produzidos no sistema orgânico, em virtude principalmente do tipo de adubação (ARBOS, 2010).

Estudos indicam a saúde como motriz predominante na intenção de compra do alimento orgânico. Os produtos orgânicos são considerados mais seguros, com melhores níveis de vitaminas e minerais e de sabor mais agradável que o produto convencional. Essas afirmações, no entanto, não puderam ser confirmadas até o momento (MICHAELIDOU; HASSAN, 2008; ABREU, 2008; ARBOS, 2009). Alguns trabalhos identificaram diferenças nas concentrações de resíduos químicos e de vitaminas entre o produto orgânico e convencional, mas não puderam mostrar definitivamente que o método de produção, e não outros fatores tais como a variedade de planta, condições meteorológicas, e o tipo do solo, causaram as diferenças observadas (DOYLE, 2006).

No imaginário popular, tem-se a idéia de que produtos provenientes do sistema orgânico de produção são saudáveis e não apresentam nenhum risco à saúde, em grande parte devido o apelo de *marketing* das hortaliças orgânicas. Esta análise torna-se preocupante por ser este um produto consumido cru (SILVA, 2005). No mundo e também no Brasil existe a tendência do consumidor valorizar produtos considerados mais

saudáveis, como o alimento orgânico, por ele ser identificado como benéfico para a saúde. Essa constatação tem sido detectada em várias pesquisas de mercado. Convém lembrar que esta tendência tem base em uma percepção subjetiva do consumidor a respeito de tais produtos. Entre seus principais fatores de motivação para comprar produtos orgânicos estão a saúde pessoal e da família, seguidas da não utilização de agroquímicos nos produtos, do valor biológico, do sabor e do aroma e, por último, da preocupação com o meio ambiente (MAGKOS *et al.*, 2003; BUAINAIN; BATALHA, 2007; SEBRAE/NA, 2011a).

Em contraste com a percepção popular que os resíduos químicos no alimento são a fonte principal de contaminação, as manifestações das doenças agudas de origem alimentar demonstraram que os perigos microbianos são muito mais significativos para a segurança dos alimentos (MAGKOS *et al.*, 2003). Poucas informações têm sido descritas sobre a contaminação microbiana em alimentos orgânicos. A realização de estudos que relacionem o consumo de alimentos orgânicos e suas implicações para a saúde humana preencheria uma grande lacuna (ABREU *et al.*, 2010; LIMA; VIANELLO, 2011; FERNÁNDEZ-FUENTES *et al.*, 2012).

Greig e Ravel (2009) analisaram 4.093 surtos de infecção de origem alimentar que ocorreram no mundo, entre os anos 1995 e 2005, e *E. coli* foi responsável por 9,5% dos casos, sendo a terceira causa de infecção, perdendo para *Salmonella* spp. e Norovírus. Dados epidemiológicos disponibilizados por órgãos de controle sanitário dos Estados Unidos mostram que dentre os 2.167 surtos registrados entre 1998 a 2002, com etiologia conhecida, 55% foram causados por bactérias. No Brasil, entre os anos 1999 a 2008, as bactérias foram identificadas como o agente etiológico responsável de 84% dos surtos. No Rio Grande do Sul, Estado que conta com um dos mais ativos serviços de vigilância sanitária e epidemiológica do Brasil, foram notificados 3.200 surtos de 1998 a 2006, sendo que a maioria deles foi causada por bactérias, entre elas *Salmonella*, *Stafilococcus aureus* e *E. coli* (OLIVEIRA, 2010a). No estado do Paraná, os dados epidemiológicos mostram que entre 1999 a 2008, ocorreram 286 surtos de salmonelose envolvendo 5.641 pessoas, das quais 2.027 (35,9%) manifestaram sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. O sorovar prevalente foi Enteritidis,

correspondendo 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos (KOTTWITZ *et al.*, 2010).

Nos últimos anos há uma preocupação crescente em relação aos produtos vegetais, principalmente os produzidos no sistema orgânico, pois inúmeros casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos têm sido relatados em todo o mundo. Apesar de que em algumas investigações patógenos não foram detectados, outros relataram alta incidência destes, indicando o potencial dos vegetais como causador de surtos de origem alimentar (SEOW *et al.*, 2012).

Santos *et al.* (2010) não detectaram a presença de *Salmonella* em nenhuma das amostras de vegetais analisada. Embora a maioria dos produtos analisados estavam de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC 12/01 da ANVISA, 29% das amostras estavam em desacordo com essa resolução. Dentre as amostras em desacordo, 8% apresentaram contagem de *E. coli* dez vezes acima do limite e 6% contagem 100 vezes superior. As amostras predominantemente em desacordo com a legislação vigente foram as hortaliças (33% das amostras), sendo a maioria destinada ao consumo direto sem cocção (alface, agrião, rúcula e saladas mistas).

Segundo Arbos (2009) o padrão microbiológico das amostras de alface e cenoura orgânicas foi inferior às amostras de tomate analisadas, uma vez que as primeiras apresentaram contagens de *E. coli* e *Salmonella* spp. superiores ao tolerado pela legislação brasileira, bem como foi detectado presença de estruturas parasitárias. A contaminação dessas hortaliças pode ter ocorrido através do uso de água de irrigação contaminada, presença de animais silvestres ou domésticos, solo contaminado ou emprego de adubos sem tempo de compostagem adequado. Badosa *et al.* (2008) também encontraram *Salmonella* spp. e *E. coli* em vegetais prontos para consumo na Espanha.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos relatou um aumento no número de surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a vegetais entre 1995 e 2005 em todo o mundo. Nos EUA, vegetais foram associados a uma proporção crescente de



surtos de origem alimentar, passando de <1% em 1970 para 6% na década de 1990. Alface e espinafre contaminados por ETEC e *E. coli* O157:H7 resultaram em surtos de gastroenterite em vários estados americanos. Surtos de salmonelose ocorreram devido o consumo de tomates contaminados, broto de feijão, melão e melancia (SEOW *et al.*, 2012).

No início de maio de 2011 autoridades de saúde da Alemanha notificaram um surto de diarreia sanguinolenta, com vários casos de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU), no norte da Alemanha, em outros países da Europa (Áustria, República Tcheca, Dinamarca, França, Holanda, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça e Reino Unido), nos Estados Unidos e no Canadá. Até a última semana de junho de 2011 tinham sido notificados, em toda a Europa, mais de 4 mil casos de diarreia relacionados à *E. coli* O104:H4, com quase 900 casos de SHU e 48 óbitos. Segundo os estudos epidemiológicos, a fonte primária de transmissão foram brotos de alfafa produzidos no norte da Alemanha (CVE, 2011).

Vários surtos de salmonelose associados a alimentos de origem vegetal consumidos *in natura* foram relatados nos Estados Unidos nos últimos anos. Um surto com 25 pessoas foi relatado em 2011, devido ao consumo de broto de alfafa contaminado com *Salmonella* Enteritidis (CDC, 2011b). Outro surto ocorrido no mesmo anos foi notificado em 25 estados norte americano, envolvendo um total de 106 indivíduos, devido ao consumo de mamão contaminado com *S. Agona* (CDC, 2011c). Em 2008, pimentas e tomates foram uma importante fonte de contaminação por *Salmonella* spp. (CDC, 2008) e um surto devido a tomates contaminados com *S. Typhimurium* ocorreu em 2006 envolvendo 183 pessoas em 21 estados americanos (CDC, 2006b).

Em 1995, dois surtos na França foram associados à salada de maionese com lagostim, alface e pepino em conserva, totalizando 59 casos dos quais EPEC O111 foi isolada. Em 1998, uma salada de batata contaminada com ETEC foi responsável por um grande surto nos EUA, envolvendo mais de 4.500 pessoas (KASNOWSKI, 2004). Em 2010, um total de 33 casos confirmados estavam envolvidos num surto por *E. coli* O145 a partir de alface picado e embalado nos EUA (CDC, 2010). Em novembro de 2011, 60 pessoas infectadas com *E. coli* O157:H7 foi relatado nos EUA e autoridades indicam que alface foi a provável fonte da doenças neste surto (CDC, 2011d). Um total

de 14 indivíduos infectados com *E. coli* O26 devido a contaminação de brotos (CDC, 2012a). Um surto envolvendo 199 pessoas foi notificado nos EUA em 2006, entre as pessoas doentes, 102 foram hospitalizados, 31 desenvolveram síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e 3 morreram, a cepa envolvida foi *E. coli* O157:H7 presente em espinafre (CDC, 2006a).

### 3.5 Métodos de Isolamento e Identificação de *Salmonella* spp. e *E. coli*

Os métodos de tipagem de micro-organismos são baseados na caracterização fenotípica e genotípica. As técnicas baseadas em características fenotípicas utilizadas nas investigações epidemiológicas são biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, resistência a antimicrobianos e perfil de proteínas bacterianas (DARINI, 1994; BESSA, 2006). Porém, os métodos fenotípicos são limitados porque os micro-organismos podem alterar a expressão de genes e um mesmo genótipo apresentando fenótipos distintos (BUSCH; NITSCHKO, 1999).

As técnicas convencionais de microbiologia de alimentos utilizam meios de cultura não-seletivos e seletivos, testes bioquímicos diferenciais (biotipagem), e testes sorológicos (GANDRA *et al.*, 2008).

Para a identificação de *Salmonella* spp. em alimentos é recomendado o pré-enriquecimento em caldo lactose ou água peptonada tamponada, seguido por enriquecimento seletivo em caldos Rappaport-Vassiliadis (RV), Tetracionato (TT) ou Selenito-Cistina (SC). Posteriormente, alíquotas do enriquecimento são semeadas em meios seletivos e diferenciais, tais como, ágar Hektoen (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) e ágar Bismuto Sulfito (BS). As colônias suspeitas são submetidas à triagem bioquímica e, para confirmação de *Salmonella* spp., é realizado sorologia com anti-soros polivalentes somático e flagelar. A identificação do sorovar é realizada somente por laboratórios credenciados ou de referência (SILVA *et al.*, 2007).

O método clássico de contagem de coliformes totais e *E. coli* em água e alimentos é o do Número Mais Provável (NMP), que consiste em inocular alíquotas de 1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em Caldo Lauril

Sulfato Triptose (LST), Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Caldo Lactose (CL) com tubos de Durham invertidos e incubar a 35 °C por 24-48 h, em seguida uma alçada de cada tubo que apresentar crescimento e produção de gás é semeada em tubos contendo Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) e Caldo EC com tubos de Durham invertidos e incubar a 35 °C por 24-48 h e 45 °C por 24-48 h, respectivamente. A formação de gás nos tubos de CLBVB indica a presença de coliformes totais, sendo o resultado expresso em NMP de coliformes totais por grama de alimentos. Para contagem de *E. coli*, os tubos de E.C. com gás são repicados para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno-EMB e incubadas a 35 °C. Após 24 h, colônias negras com ou sem brilho metálico, suspeitas de *E. coli*, são identificadas bioquimicamente. As placas de EMB positivas para *E. coli*, correspondentes aos tubos de EC positivos com gás, são consideradas para o cálculo de número mais provável por grama de alimento (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Um dos métodos rápidos mais utilizados para detecção de coliformes totais e *E. coli* em alimentos é o Petrifilm EC, descrito no Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed (SANTOS, 2010). O Petrifilm EC é composto por nutriente VRB (Violet Red Bile), ágar solúvel em água fria, indicador cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) e um substrato cromogênico para  $\beta$ -glucuronidase. Estes componentes facilitam a contagem e a distinção de coliformes totais e *E. coli*. A incubação do Petrifilm EC é realizada por 24-48 horas a 35°C  $\pm$  1°C. A contagem e identificação de colônias de coliforme total é evidenciada pela presença de colônias vermelhas com a formação de bolhas de gás. Para *E. coli* é evidenciada a presença de colônias azuis com a formação de bolhas de gás (VAIL *et al.*, 2003; CONSOLI *et al.*, 2006; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). O resultado é expresso em unidade formadora de colônia por grama de alimentos (UFC/g) e para confirmação de *E. coli*, colônias são submetidas às provas bioquímicas Tríplice Ágar Ferro, Citrato de Simmons, Indol, Vermelho de Metila e Teste de Voges-Proskauer (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Para a indústria de alimentos, que retem os seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos, tempo prolongado de espera significa perdas econômicas (BENETTI, 2009). Por isso, métodos rápidos e sensíveis

para a identificação de *Salmonella* spp. e *E. coli* em diferentes matrizes alimentares são necessários (SCHRANK *et al.*, 2001; BASTOS, 2009).

Atualmente, diversas técnicas moleculares são usadas na detecção de *Salmonella* spp. (NAM *et al.*, 2005; HEIN *et al.*, 2006; O'REGAN *et al.*, 2008; CARDONA-CASTRO *et al.*, 2009; AKIBA; KUSUMOTO; IWATA, 2011; LIU *et al.*, 2011; PUI *et al.*, 2011) e de *E. coli* enteropatogênicas (ELLINGSON *et al.*, 2004; AUVRAY *et al.*, 2007; CHIA *et al.*, 2009; DUNKLEY *et al.*, 2009; GALLEGOS-ROBLES *et al.*, 2009; RIYAZ-UL-HASSAN *et al.*, 2009; CHIANG *et al.*, 2012; ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; KAGAMBÈGA *et al.*, 2012; SHELTO *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2012) em alimentos, pois estas aumentam a sensibilidade e especificidade da identificação.

### 3.6 PCR para detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli* diarreio gênicas

A PCR foi desenvolvida em 1985 por Kary B. Mullis. Basicamente, o método consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores e da enzima DNA polimerase para sintetizar *in vitro* novas sequências do DNA. O ensaio é realizado em três etapas (desnaturação, hibridação dos iniciadores e polimerização da sequência alvo), que se repetem de 30 a 40 vezes, gerando  $2^n$  cópias da região de interesse do DNA, onde n é igual ao número de ciclos da reação (GARCIA; MA, 2005; GANDRA *et al.*, 2008; ALVES, 2010).

Esta técnica permitiu maior confiabilidade na identificação de micro-organismos em alimentos, e é uma importante ferramenta na investigação de surtos de toxinfecções alimentares (RIYAZ-UI-HASSAN; VERMA; QAZI, 2004). A rapidez, a sensibilidade e a especificidade na identificação de agentes bacterianos em comparação ao método convencional microbiológico fazem da PCR uma alternativa prática, dentre os métodos de diagnóstico de doenças transmitidas por alimentos (KUMAR; SURENDRAN; THAMPURAN, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

Os principais obstáculos da implantação da técnica de PCR na rotina laboratorial são: a incapacidade do método em diferenciar entre células vivas e mortas, a presença de inibidores da enzima DNA polimerase em certas

matrizes alimentares, o alto investimento dos equipamentos e reagentes (MALORNY *et al.*, 2003).

Com o objetivo de melhorar a especificidade e a eficiência da técnica existem variações da reação em cadeia da polimerase, como a RT-PCR (Reação da Transcriptase Reversa), Nested-PCR, RFLP-PCR (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição), PCR ribotipagem, PCR em tempo real e PCRM (PCR Multiplex) (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008; GANDRA *et al.*, 2008).

O surgimento da PCRM facilitou a detecção de diferentes espécies de micro-organismos simultaneamente, porque utiliza mais do que um par de iniciadores para identificação de sequências específicas de DNA em uma mesma amostra e tem grande potencial para ser aplicado na rotina laboratorial. A PCRM apresenta vantagens em relação a PCR convencional, pois reduz a intensidade e tempo de trabalho laboratorial, bem como o uso de reagentes e conseqüentemente os custos (PERRY *et al.*, 2007).

Desde a sua primeira descrição, em 1988 (CHAMBERLAIN *et al.*, 1988), a PCRM é utilizada com sucesso na detecção de diferentes micro-organismos, como *Salmonella* spp., *S. Typhi* e *S. Typhimurium* em frutas fatiadas (PUI *et al.*, 2011), *E. coli* em vegetais (BADOSA, 2008; CDC, 2010; CDC, 2011; CDC, 2012; OLIVEIRA, 2012; SEOW, 2012). Porém a especificidade e o sucesso da PCR, especialmente da PCRM depende da escolha correta dos oligonucleotídeos iniciadores. Os iniciadores devem ser comuns à maioria das cepas e não apresentar homologia com outros micro-organismos (MACIOROWSKI *et al.*, 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos empregados neste trabalho estão apresentados na Tabela 2. Os isolados pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR; à coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia da UEL; à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde (CCBS), sub-coleção de *Campylobacter* (CCAMP) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ; ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), Curitiba, PR e ao Instituto Biológico de São Paulo (IB/CAPTAA), Descalvado, SP. *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* enteropatogênica 2348/69 e *Escherichia coli* enterotoxigênica H10407 foram utilizados como controle positivo.

**Tabela 2** - Isolados bacterianos utilizados neste estudo e suas procedências.

Isolados Bacterianos			
Micro-organismo	Procedência	Micro-organismo	Procedência
S. Adelaide	LACEN <sup>c</sup>	<i>Campylobacter coli</i> CCAMP 1003	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Anatum	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. coli</i> CCAMP 1008	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Agona	UEL <sup>b</sup>	<i>C. coli</i> CCAMP 595	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Bredeney	LACEN <sup>c</sup>	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Dublin	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 971	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Derby	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 594	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Enteritidis ATCC 13076	UEL <sup>b</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 1014	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Infantis	UEL <sup>b</sup>	<i>Citrobacter freudii</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Johannesburg	LACEN <sup>c</sup>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Kentucky	IB <sup>d</sup>	<i>E. cloacae</i>	UEL <sup>b</sup>
S. London	LACEN <sup>c</sup>	<i>Escherichia coli</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Montevideo	UEL <sup>b</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Muenchen	LACEN <sup>c</sup>	<i>Morganella morganii</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Newport	LACEN <sup>c</sup>	<i>Proteus mirabilis</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Panama	LACEN <sup>c</sup>	<i>Shigella sonnei</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Senftenberg	LACEN <sup>c</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Typhi	LACEN <sup>c</sup>	<i>S.saprophyticus</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Typhimurium ATCC 14028	UEL <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> enteropatogênica 2348/69	UEL <sup>e</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	UEL <sup>c</sup>	<i>E.coli</i> enterotoxigênica H10407	UEL <sup>e</sup>

<sup>a</sup> FIOCRUZ, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ.

<sup>b</sup> UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

<sup>c</sup> LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Unidade Guatupê, São José dos Pinhais, PR.

<sup>d</sup> IB, Instituto Biológico de São Paulo, Descalvado, SP.

<sup>e</sup> UEL, Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

## 4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

### 4.2.1 Extração do DNA

Todos os isolados, com exceção de *Campylobacter* spp. foram cultivados em caldo infusão cérebro e coração (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia) a 37 °C por 24 h até atingir a concentração média de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Os isolados de *Campylobacter* spp. foram cultivados em caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) à 42 °C por 48 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac). As concentrações celulares foram estimadas pelo método de contagem na gota (MILES; MISRA, 1938). Alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 14000 x g por 10 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi lavado com 1 mL de água peptonada a 1% esterilizada (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), centrifugado por 10 min a 14000 x g (TA) e ressuspensado com 50 µL de solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) (ALBOLMAATY *et al.*, 2000). As suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min, centrifugadas por 5 min a 14000 x g (TA) e o sobrenadante foi utilizado como DNA alvo para a PCR.

### 4.2.2 PCRM para detecção de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica 2348/69 e *Escherichia coli* enterotoxigênica H10407

Para a identificação do gênero *Salmonella* spp. foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador Styinva-JHO-2, que amplifica a região que codifica o gene *invA*. Para a amplificação do gene *lt*, presente em ETEC, foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador *LT*, e para a detecção do gene *eae*, presente em EPEC e EHEC, foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador *eae*, como apresentado na Tabela 3.



**Tabela 3** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação PCRm para detecção de *Salmonella* spp., gene *eae* e *It*.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
Stylnva-JHO-2 HOOFAR <i>et al.</i> , 2000	Right AAACGTTGAAAACTGAGGA Left TCGTCATTCCATTACCTACC	119pb
<i>It</i> GÓMEZ-DUARTE <i>et al.</i> , 2009	Forward GCACACGGAGCTCCTCAGTC Reverse TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	218pb
<i>eae</i> FAROOQ <i>et al.</i> , 2009	Forward GACCCGGCACAAGCATAAGC Reverse CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384pb

A PCRm foi realizada com 0,5  $\mu$ M dos iniciadores Stylnva-JHO-2-left e Stylnva-JHO-2-right (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 0,3  $\mu$ M de *eae*-R e *eae*-F (IDT - Integrated DNA Technologies Prodimol) e 0,3  $\mu$ M de *It*-R e *It*-F (IDT - Integrated DNA Technologies Prodimol). O volume final da reação foi de 20  $\mu$ L, contendo 4  $\mu$ L de DNA, 2  $\mu$ L de tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 0,6 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA) e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de amplificação conduzidas no termociclador (TC-412) (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) foram de desnaturação inicial 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 s, hibridação dos iniciadores a 60°C por 60 s, polimerização da sequência alvo a 72°C por 60 s e polimerização da sequência alvo final de 10 min a 72°C.

A condição ótima de hibridação foi determinada após realização da PCR com gradiente de temperatura (55°C, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C) e de concentrações de: magnésio (2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM), dNTPs (0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM), oligonucleotídeo iniciador (0,2  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 0,6  $\mu$ M) e *Taq* DNA polimerase (0,5 U, 1 U, 1,5 U, 2 U, 2,5 U).

### **4.2.3 Análise dos produtos de amplificação**

Após a amplificação, foram adicionados 4  $\mu$ L de tampão de amostra [Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, EUA) 15%; azul de bromofenol (Synth) 0,25%]. Alíquotas de 10  $\mu$ L dessa mistura foram analisadas em gel de agarose (BioAmerica, Miami, FL, USA) a 1,5% acrescidos de 0,02  $\mu$ L/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen).

A eletroforese foi realizada a 80 V por 50 min, em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM]. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV em transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

### **4.2.4 Análise da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores**

A avaliação da especificidade dos iniciadores foi realizada com diferentes espécies bacterianas, descritas na Tabela 2. *S. Enteritidis* ATCC 13076, EPEC 2348/69 e ETEC H10407 foram utilizados como controle positivo e o controle negativo foi realizado com água ultrapura. O DNA dos microorganismos testados foi extraído de acordo com o item 4.2.1 e utilizado para o teste de especificidade.

### **4.2.5 Avaliação do limite de detecção do ensaio PCRm**

O limite de detecção foi determinado com suspensões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, EPEC 2348/69 e ETEC H10407 cultivadas em caldo BHI (HiMedia) a 37 °C por 24 h e o DNA de acordo com o item 4.2.1. Diluições seriadas foram feitas com água peptonada tamponada 0,1% (Becton, Dickinson and Company) para obtenção de suspensões de  $10^0$  a  $10^8$  UFC/mL.

As concentrações celulares foram estimadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD, Becton, Dickinson and Company) para *Salmonella* spp. e em ágar MacConkey (HiMedia) para *E. coli* pelo método de contagem em gotas (MILES; MISRA, 1938).

#### **4.3 Análise por PCRm de hortaliças folhosas artificialmente contaminada**

Porções de 25g de hortaliças folhosas não contaminadas com *Salmonella* spp. e *E. coli* foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada (Becton, Dickinson and Company) e 1mL de suspensões de *Salmonella*, EPEC e ETEC separadamente, para obtenção de aproximadamente  $10^{-1}$  a  $10^8$  UFC/mL, e massageadas manualmente por 30 s (adaptado de ALVES, 2010 e SAEKI, 2011). Os enxágues contaminados seguiram filtração em porta-filtro (Filter Holder with Receiver, PSF, 47 mm, 250 mL, Nalger Nunc International - USA) com membrana de nylon 0,45 $\mu$ m (Millipore Indústria e Comércio Ltda.), a membrana foi enxaguada com 10 mL de água peptonada tamponada e esta foi incubada a 37°C por 24 h. Após este período, 1 mL do enxágue foi utilizado para extração do DNA por fervura e o material obtido testado na PCRm.

#### **4.4 Análise microbiológica e PCRm de hortaliças folhosas artificialmente e naturalmente contaminadas**

Cento e duas amostras de hortaliças folhosas (Tabela 4) foram adquiridas em feiras livres no município de Londrina PR, entre Agosto e Dezembro de 2011. Alíquotas de 25g de hortaliças folhosas foram adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Becton, Dickinson and Company), homogeneizadas manualmente, filtradas em porta-filtro (Filter Holder with Receiver, PSF, 47 mm, 250 mL, Nalger Nunc International - USA) com membrana de nylon 0,45 $\mu$ m (Millipore Indústria e Comércio Ltda.), a

membrana foi enxaguada com 10 mL de água peptonada tamponada e esta foi incubada a 37°C por 24 h (enriquecimento não seletivo).

**Tabela 4** – Amostragem.

<b>Variedade</b>	<b>Porcentagem</b>
Acelga	47,05% (n=14)
Alface	13,72% (n=48)
Almeirão	20,59% (n=21)
Chicória	9,8% (n=10)
Espinafre	0,98% (n=1)
Mostarda	0,98% (n=1)
Rúcula	5,9% (n=6)
Serralha	0,98% (n=1)
<b>TOTAL</b>	<b>100% (n=102)</b>

#### **4.4.1 Pesquisa de *Salmonella* spp. e *E. coli* pelo método microbiológico convencional**

Para a pesquisa de *Salmonella*, após o enriquecimento não seletivo em água peptonada (realizado conforme item 4.4), alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Tetrionato (TT; HiMedia) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV; HiMedia). O caldo TT foi incubado a 37°C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Após esses períodos, as amostras foram semeadas em ágar Hektoen (Becton, Dickinson and Company) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) (Becton, Dickinson and Company), incubados a 37°C por 24 h. Colônias características de *Salmonella* spp. que promoveram a descarboxilação da lisina, não hidrolisaram uréia, apresentaram motilidade e a não produção de indol foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Becton, Dickinson and Company) (Anexo 1).

Para a pesquisa de *E. coli*, a partir da água de enxágue da membrana (realizado conforme item 4.4), realizou-se diluições seriadas em água peptonada tamponada 1% (Becton, Dickinson and Company) e inóculo de

1 mL em placa de Petrifilm EC (3M, Saint Paul, USA), incubadas a 37°C por 24-48 h. Colônias características de *E. coli* foram enumeradas e seguiram testes bioquímicos de utilização de citrato como única fonte de carbono, produção de indol e degradação de lactose (Anexo 1).

#### **4.4.2 Pesquisa de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *It* por PCRm**

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *It* por PCRm, realizou-se a extração de DNA por fervura de 1 mL do enriquecimento não seletivo (realizado conforme item 4.4). O DNA obtido foi utilizado na PCRm padronizada.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *It* de *Escherichia coli* em hortaliças orgânicas.**

Este item está apresentado na forma de um artigo, que será submetida à revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

**PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *It* de *Escherichia coli* em hortaliças orgânicas.**

**Raissa Curti Bonfante<sup>a,\*</sup>, Erika Kushikawa Saeki<sup>a</sup>, Juliane Alves<sup>a</sup> e Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

**\*Correspondência do autor:** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55-43-3371-4565; Fax: +55-43-3371-4080; e-mail: raissa\_curti@hotmail.com

**Endereço postal completo de cada filiação:**

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55-43-3371-4565; Fax: +55-43-3371-4080.

**Endereço de e-mail de cada autor:**

Raissa Curti Bonfante: raissa\_curti@hotmail.com

Erika Kushikawa Saeki: erikaksaeki@gmail.com

Juliane Alves: julianealves@yahoo.com.br

Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira: terezaoliveira@yahoo.com

## RESUMO

Hortaliças orgânicas podem estar contaminadas com *Salmonella* e alguns patótipos de *Escherichia coli*, que são importantes causas de doenças transmitidas por alimentos. O Objetivo deste estudo foi desenvolver uma reação em cadeia da polimerase multiplex (PCRm) para detectar simultaneamente *Salmonella* spp e os genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas. O volume final de reação foi de 20 µL, contendo 4 µL de DNA alvo, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 mM de dNTPs, 0,5 mM de StyinvaJHO2-R e StyinvaJHO2-F (específico para *Salmonella* spp.), 0,3 mM de *lt*-R e *lt*-F (específico para o gene *lt* de *E. coli*), 0,3 mM de *eae*-R e *eae*-F (específico para o gene *eae* de *E. coli*) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 95 °C por 5 min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 60 s, hibridação a 60 °C por 60s, polimerização da sequência alvo a 72 °C por 60 s e polimerização da sequência alvo final a 72 °C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5% acrescidos de 0,02 µL/mL de SYBR®Safe. Cento e duas amostras de hortaliças orgânicas foram analisadas por PCRm e em paralelo pelo método convencional. Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. por ambos os métodos. Das trinta e quatro amostras positivas para *E. coli* pelo método convencional, em uma das amostras foi isolada *E. coli* com o gene LT e em uma outra amostra *E. coli* com o gene *eae*. A PCRm pode ser usada como uma ferramenta de triagem em vegetais orgânicos para a detecção rápida de *Salmonella*, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* que contêm o gene *eae*.

**Palavras-chave:** PCR multiplex, hortaliças orgânicas, gastroenterites.

## ABSTRACT

Organic vegetables can be contaminated with *Salmonella* and some patotypes of *E. coli* that are important causes of foodborne illness. The aim of this study was to develop a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) to detect simultaneously *Salmonella* spp. and the genes *eae* and *lt* of *E. coli* in organic vegetables. The final volume of the reaction was 20 µL, containing 4 µL of DNA template, 4 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0,6 mM of dNTPs, 0.5 mM of StyinvaJHO2-R and StyinvaJHO2-F (specific to *Salmonella* spp.), 0.3 mM of *lt*-R and *lt*-F (specific to *lt* gene of *E. coli*), 0.3 mM of *eae*-R and *eae*-F (specific to *eae* gene of *E. coli*), and 1U of *Taq* DNA polymerase. Amplification conditions were initial denaturation at 95 °C for 5 min., followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 60 s, annealing at 60 °C for 60 s, extension at 72 °C for 60 s and final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were visualized on agarose gel 1.5% and 0.02 µL/mL of SYBR®Safe. One hundred and two samples of organic vegetables were analyzed by the developed mPCR and in parallel by the conventional method. All samples were negative for *Salmonella* spp. by both methods. Thirty four samples were positive for *E. coli* by the conventional method. *E. coli* with *lt* gene was detected in one sample and another one was contaminated with *E. coli* that contained *eae* gene. The mPCR can be used as a screening tool in organic vegetables for rapid detection of *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and *E. coli* that contain *eae* gene.

**Keywords:** multiplex PCR, organic vegetables, foodborne illness.



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e hortaliças tem sido estimulado pelos benefícios que trazem à saúde. Recentemente, a preocupação com o meio ambiente, com a segurança alimentar, com a saúde e com o bem-estar levou ao aumento da produção de produtos orgânicos. A demanda por esses produtos cresce na Europa a taxa de 40% ao ano de acordo com a *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM, 2011). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, nos próximos anos, o mercado pode crescer entre 61 a 94 bilhões de dólares nos países com mercados orgânicos certificados, ou entre 3,5 a 5% no mercado global de alimentos (Mercado de Orgânicos, 2011). As informações sobre a produção da agricultura orgânica no Brasil ainda são relativamente escassas e não existe controle sistemático dos dados de produção por nenhum órgão federal (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

As autoridades sanitárias de diferentes países relataram o aumento de surtos relacionados ao consumo de frutas e hortaliças contaminadas (WHO, 2007; SEOW *et al.*, 2012). Dos surtos que ocorreram no Brasil entre 2000 e 2011, dos quais foi possível a identificação do micro-organismo envolvido, *Salmonella* spp. foi responsável por 42,3% e *E. coli* por 10,5%. As hortaliças foram responsáveis por 12,5% desses surtos (SVS, 2011). Embora os patótipos de *E. coli* não tenham sido identificados, isolados de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) são responsáveis no Brasil por, aproximadamente, 30% dos casos de diarreia em crianças de baixa renda (BLANCO, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), patótipos de *E. coli* enterotoxigênica são a causa mais comum de diarreia em maiores de cinco anos (RIVERA, 2010).

Apesar da importância do estudo da segurança de alimentos orgânicos para a saúde humana, um número limitado de estudos foi realizado para averiguar os riscos microbiológicos que estes alimentos oferecem (MAGKOS *et al.*, 2003; LAIRON, 2009; SEOW *et al.*, 2012).

A PCR multiplex (PCRm), que é uma variação da PCR convencional, pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, sequências alvo de diferentes micro-organismos patogênicos em uma única

reação, com grande potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (GANDRA *et al.*, 2008). Diversos ensaios de PCR para detecção individual ou simultânea de *Salmonella* spp., de EHEC O157:H7 e outras bactéria patogênicas em frutas e hortaliças cruas e processadas já foram padronizados (OLIVEIRA *et al.*, 2003; ELIZQUÍVEL; AZNAR, 2008; GALLEGOS-ROBLES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; PUI *et al.*, 2011; DIANA; PUI; SON *et al.*, 2012; ELIZQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; XU *et al.*, 2012). Não é do nosso conhecimento, no entanto, a padronização de PCRm para detecção de *Salmonella* spp. e genes de virulência de *E. coli* em hortaliças orgânicas.

No presente estudo foi desenvolvida uma nova proposta de PCRm para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas, diante da importância dessas bactérias na cadeia de produção desses alimentos, bem como para o diagnóstico de gastroenterites.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados bacterianos e extração do DNA

Os isolados bacterianos empregados neste trabalho estão listados na Tabela 1. Todos os isolados, com exceção de *Campylobacter* spp. foram cultivados em caldo infusão cérebro e coração (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia) a 37°C por 24 h até atingir a concentração média de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Os isolados de *Campylobacter* spp. foram cultivados em caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) à 42 °C por 48 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac). As concentrações celulares foram estimadas pelo método de contagem na gota (MILES; MISRA, 1938).

Alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 14000 x g por 10 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi lavado com 1 mL de água peptonada a 1% (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), centrifugado por 10 min a 14000 x g (TA) e ressuspenso com 50 µL de solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg

azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) (ALBOLMAATY *et al.*, 2000). As suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min, centrifugadas por 5 min a 14000 x g (TA) e o sobrenadante foi utilizado como DNA alvo para a padronização da PCR.

**Tabela 1** - Isolados bacterianos utilizados neste estudo e suas procedências.

Isolados Bacterianos			
Micro-organismo	Procedência	Micro-organismo	Procedência
S. Adelaide	LACEN <sup>c</sup>	<i>Campylobacter coli</i> CCAMP 1003	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Anatum	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. coli</i> CCAMP 1008	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Agona	UEL <sup>b</sup>	<i>C. coli</i> CCAMP 595	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Bredeney	LACEN <sup>c</sup>	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Dublin	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 971	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Derby	LACEN <sup>c</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 594	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Enteritidis ATCC 13076	UEL <sup>b</sup>	<i>C. jejuni</i> CCAMP 1014	FIOCRUZ <sup>a</sup>
S. Infantis	UEL <sup>b</sup>	<i>Citrobacter freundii</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Johannesburg	LACEN <sup>c</sup>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Kentucky	IB <sup>d</sup>	<i>E. cloacae</i>	UEL <sup>b</sup>
S. London	LACEN <sup>c</sup>	<i>Escherichia coli</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Montevideo	UEL <sup>b</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Muenchen	LACEN <sup>c</sup>	<i>Morganella morganii</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Newport	LACEN <sup>c</sup>	<i>Proteus mirabilis</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Panama	LACEN <sup>c</sup>	<i>Shigella sonnei</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Senftenberg	LACEN <sup>c</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Typhi	LACEN <sup>c</sup>	<i>S.saprophyticus</i>	UEL <sup>b</sup>
S. Typhimurium ATCC 14028	UEL <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> enteropatogênica 2348/69	UEL <sup>e</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	UEL <sup>c</sup>	<i>E.coli</i> enterotoxigênica H10407	UEL <sup>e</sup>

<sup>a</sup> FIOCRUZ, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ.

<sup>b</sup> UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

<sup>c</sup> LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Unidade Guatupê, São José dos Pinhais, PR.

<sup>d</sup> IB, Instituto Biológico de São Paulo, Descalvado, SP.

<sup>e</sup> UEL, Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

## 2.2 PCRM para detecção de *Salmonella* spp., do gene *eae* e *It* de *Escherichia coli* em culturas puras

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a padronização da PCRM foram Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para o gênero *Salmonella* (HOOFAR *et al.*, 2000); LT-F e LT-R, específicos para o gene *It* (GÓMEZ-DUARTE *et al.*, 2009) e *eae*-F e *eae*-R, específicos para o gene *eae* (FAROOQ *et al.*, 2009).

As sequências dos iniciadores utilizados, bem como o tamanho das sequências de DNA amplificadas, estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação PCRm para detecção de *Salmonella* spp, gene *eae* e *LT*.

Oligonucleotídeo	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
Styinv-JHO-2	Right AAACGTTGAAAACTGAGGA Left TCGTCATTCCATTACCTACC	119pb
<i>lt</i>	Forward GCACACGGAGCTCCTCAGTC Reverse TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	218pb
<i>eae</i>	Forward GACCCGGCACAAGCATAAGC Reverse CACCTGCAGCAACAAGAGG	384pb

O volume final da reação foi de 20  $\mu$ L, contendo 4  $\mu$ L de DNA, 2  $\mu$ L de tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 0,6 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA) e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). A PCRm foi realizada com 0,5  $\mu$ M dos iniciadores Styinv-JHO-2-left e Styinv-JHO-2-right (IDT-Integrated DNA Technologies Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 0,3  $\mu$ M de *eae*-R e *eae*-F (IDT - Integrated DNA Technologies Prodimol) e 0,3  $\mu$ M de *lt*-R e *lt*-F (IDT - Integrated DNA Technologies Prodimol). As condições de amplificação conduzidas no termociclador (TC-412) (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) foram de desnaturação inicial 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 60 s, 60°C por 60 s, 72°C por 60 s e polimerização da sequência alvo final de 10 min a 72°C. Os produtos foram visualizados em gel de agarose (BioAmerica, Miami, FL, USA) a 1,5% acrescidos de 0,02  $\mu$ L/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen). Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### **2.3 Análise da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores**

A avaliação da especificidade dos iniciadores foi realizada com as diferentes espécies bacterianas listadas na Tabela 1. *S. Enteritidis* ATCC 13076, EPEC 2348/69 e ETEC H10407 foram utilizados como controles positivos, e o controle negativo foi realizado com água ultrapura. As suspensões bacterianas, a extração do DNA e o ensaio PCR foram realizados conforme descrito anteriormente.

### **2.4 Avaliação do limite de detecção do ensaio PCRm**

O limite de detecção foi determinado com suspensões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, EPEC 2348/69 e ETEC H10407 cultivadas em caldo BHI (HiMedia) a 37 °C por 24 h. Diluições seriadas foram feitas com água peptonada tamponada 0,1% (Becton, Dickinson and Company) para obtenção de suspensões de  $10^0$  a  $10^8$  UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata. As concentrações celulares foram estimadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD, Becton, Dickinson and Company) para *Salmonella* spp e em ágar MacConkey (HiMedia) para *E. coli* pelo método de contagem em gotas (MILES; MISRA, 1938). Os experimentos foram realizados em triplicata. A extração do DNA de 1 mL de cada diluição foi realizada conforme descrito previamente. Os sobrenadantes contendo o DNA foram usados na PCRm com três repetições.

### **2.5 Análise de hortaliças folhosas artificialmente contaminada pelo método tradicional**

Amostras de hortaliças (25 g) foram previamente analisadas, para a confirmação da não contaminação por *Salmonella* e *E. coli*. Porções de 25 g de hortaliças não contaminadas foram adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Becton, Dickinson and Company) e contaminadas com 1 mL de suspensões de *Salmonella*, EPEC e ETEC separadamente, para obtenção de aproximadamente  $10^{-1}$  a  $10^8$  UFC/mL. As amostras foram homogeneizadas manualmente e os enxágües filtrados em porta-filtro (Filter

Holder with Receiver, PSF, 47 mm, 250 mL, Nalger Nunc International - USA) com membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Indústria e Comércio Ltda.) A membrana foi lavada com 10 mL de água peptonada tamponada 1%. Para a pesquisa de *Salmonella*, a água de lavagem da membrana foi incubada a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Tetrionato (TT; HiMedia) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV; HiMedia). O caldo TT foi incubado a 37 °C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Os meios seletivos-diferenciais utilizados foram o ágar Hektoen (Becton, Dickinson and Company) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) (Becton, Dickinson and Company), incubados a 37°C por 24 h. A aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Becton, Dickinson and Company) foi realizada das colônias características de *Salmonella* spp., após a triagem bioquímica com as provas de descarboxilação da lisina, não hidrólise da uréia, motilidade e produção de indol.

Para a pesquisa de *E. coli*, a partir da água de enxágue da membrana de nylon, realizou-se diluições seriadas decimais em água peptonada tamponada 1% (Becton, Dickinson and Company). Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas em placas Petrifilm EC (3M, Saint Paul, USA), incubadas a 37°C por 24-48 h. Colônias características de *E. coli* foram enumeradas e confirmadas com testes bioquímicos de utilização de citrato como única fonte de carbono, produção de indol e fermentação de lactose.

## **2.6 Análise de hortaliças folhosas naturalmente contaminadas pelo método tradicional**

Cento e duas amostras das seguintes hortaliças folhosas foram analisadas: acelga (n=14), alface (n=48), almeirão (n=21); chicória (n=10); Espinafre (n=01); mostarda (n=01); rúcula (n=06); serralha (n=01). As amostras foram adquiridas em feiras livres no município de Londrina PR, entre Agosto e Dezembro de 2011. Porções de 25g das hortaliças foram adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Becton, Dickinson and Company), homogeneizadas manualmente, filtradas em porta-filtro (Filter Holder with Receiver, PSF, 47 mm, 250 mL, Nalger Nunc International - USA) com

membrana de nylon 0,45µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda.). A membrana foi enxaguada com 10 mL de água peptonada tamponada e a pesquisa de *Salmonella* spp. e contagem de *E. coli* realizadas conforme o descrito para as hortaliças contaminadas artificialmente.

## **2.7 Avaliação da PCRm padronizada para detecção de *Salmonella* spp. e dos genes *eae* e *lt* de *E. coli* em hortaliças orgânicas naturalmente e artificialmente contaminadas**

Alíquotas de 1 mL da água de lavagem das membranas de nylon incubadas a 35°C por 24 h, conforme descrito previamente para a análise microbiológica das hortaliças orgânicas naturalmente e artificialmente contaminadas, foram utilizadas na PCRm. A extração de DNA foi realizada com solução de lise TZ e fervura, conforme descrito anteriormente e o sobrenadante utilizado como DNA alvo na PCRm padronizada.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2, *eae* e *lt* foram específicos e geraram produtos de amplificação de aproximadamente 119pb, 218pb e 384pb para *Salmonella* spp., ETEC e EPEC, respectivamente. Não foi observado nenhum produto de amplificação nas reações contendo DNA das demais bactérias analisadas. O limite de detecção da PCRm foi de 10<sup>4</sup> UFC/mL. Este limite de detecção é adequado porque, em geral, a sensibilidade de ensaios multiplex é reduzida devido à detecção de mais de uma sequência de DNA alvo em uma única reação.

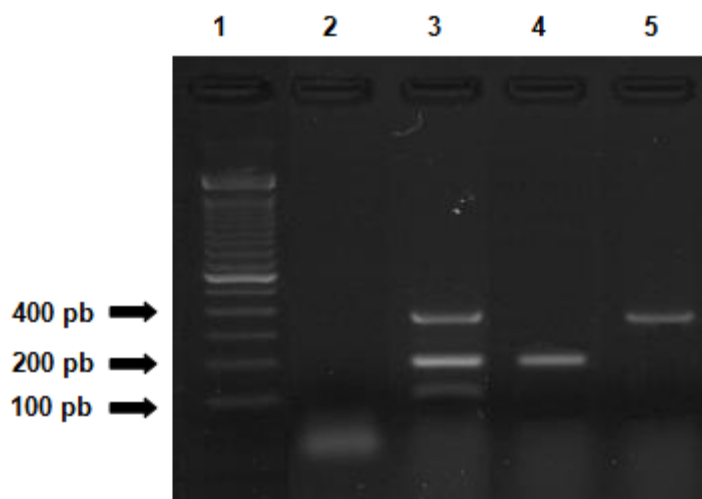
Os pares de oligonucleotídeos empregados neste trabalho foram utilizados por outros autores e foram escolhidos por estarem relacionados a fatores de virulência de *Salmonella* spp., ETEC e EPEC. O gene *invA* codifica proteínas de invasão celular (WANG *et al.*, 2009; SAEKI, 2011), o gene *lt* presente em isolados de ETEC, é responsável pela produção de toxina termolábil (LT) liberada no intestino após a colonização (KAPER, 2004; QUADRI *et al.*, 2005; STELLA, 2009) e o gene *eae* é necessário para a

produção da lesão A/E e está presente em todas as cepas de EPEC típicas e atípicas e também em isolados de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (McDANIEL; KAPER, 1997; NATARO; KAPER, 1998; CLARKE *et al.*, 2003). A identificação do gene *eae* em amostras de alimentos pode ser usada como triagem, para posterior detecção de outros fatores de virulência, tais como, gene responsável pela produção de toxina Shiga (Stx) e pela fimbria BFP (*bfp*), associado à EPEC típica.

O gene *invA* foi anteriormente testado para detecção individual por PCR de *Salmonella* spp. em frutas (GALLEGOS-ROBLES *et al.*, 2009). A detecção simultânea em hortaliças de *Salmonella* spp. e outras bactérias patogênicas intestinais também já foi relatada empregando este gene (ZHANG *et al.*, 2009; ELIZACUÍVEL, SÁNCHEZ, AZNAR, 2012; XU *et al.*, 2012). Não é do nosso conhecimento, no entanto, a publicação de trabalhos que utilizam PCRm para detectar *Salmonella* spp. e os genes de virulência *eae* e LT de *E. coli*, simultaneamente, em hortaliças.

*Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das 102 hortaliças orgânicas analisadas neste trabalho tanto pela técnica convencional quanto pela PCRm. Das trinta e quatro amostras positivas para *E. coli* pela técnica convencional, em uma das amostras foi isolada *E. coli* com o gene LT e em uma outra amostra *E. coli* com o gene *eae* (Figura 1). E as contagens de *E. coli* variaram de  $10^2$  UFC/g a  $8 \times 10^6$  UFC/g.





**Figura 1** – Análise por PCRm de amostras de hortaliças folhosas orgânicas naturalmente contaminadas. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69; 4) amostra naturalmente contaminada com *E. coli* positiva para gene *It*; 5) amostra naturalmente contaminada com *E. coli* positiva para gene *eae*.

Apesar da importância do estudo da segurança de alimentos orgânicos, somente um número limitado de estudos foram realizados para avaliar os riscos que estes alimentos oferecem (MAGKOS, *et al.* 2003; DOYLE, 2006; LAIRON, 2009).

Poucos estados brasileiros dispõem de Programas de Vigilância e levantamento de dados epidemiológicos sobre doenças de origem alimentar. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil, as hortaliças foram responsáveis por 12,5% dos surtos que ocorreram entre 2000 e 2011, porém não há informações disponíveis sobre a etiologia destes surtos (SVS, 2011).

Alguns trabalhos já foram publicados indicando a presença de *Salmonella* e *E. coli* em hortaliças e vegetais minimamente processados comercializados no Brasil. Santana *et al.* (2006) encontraram baixo padrão higiênico de amostras de alface produzidas na Bahia, que apresentavam parasitas de origem animal e humano e alta contaminação de coliformes de origem fecal. Esses resultados foram encontrados independentemente do cultivo orgânico, tradicional ou hidropônico das amostras de alface analisadas. Esses resultados indicam também baixo padrão higiênico desses produtos e a

necessidade de alertar os consumidores para a adequada higienização destes produtos antes do consumo.

Oliveira *et al.* (2011) sugeriram a necessidade de implementação de programas de qualidade na cadeia de produção de vegetais minimamente processados e prontos para consumo, comercializados na cidade de Ribeirão Preto, SP, devido à presença de *E. coli*, *Listeria spp.* e *Salmonella spp.*, respectivamente, em 53,1%; 3,7% e 1,2 % das amostras analisadas. Em um outro trabalho realizado com 512 amostras de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de São Paulo, contagens de *E. coli* acima do preconizado pela Legislação Brasileira (RDC nº 12 / 2001 - ANVISA) foram encontradas em 2,7% das amostras analisadas. *Salmonella* foi detectada em quatro amostras com contagens variando entre 2,4 a 8,8 x 10<sup>2</sup> UFC de *Salmonella* por grama. O sorovar Typhimurium, que é causa frequente de salmonelose humana no Brasil, e foi identificado em três das quatro amostras contaminadas com *Salmonella* em vegetais minimamente processados (SANT'ANA *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que a identificação de genes de virulência de *E. coli* nas amostras de hortaliças orgânicas analisadas neste trabalho indica que estes alimentos oferecem riscos à saúde do consumidor. Existe uma idéia errônea de que hortaliças provenientes do sistema orgânico são saudáveis e não apresentam risco à saúde (SILVA, 2005). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos relatou um aumento no número de surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a vegetais entre 1995 e 2005. Nesse período, alface e espinafre contaminados com ETEC e EHEC O157:H7 resultou em surtos de gastroenterite em vários estados americanos. Em maio de 2011, um surto na Alemanha e em outros países da Europa ocorreu devido a brotos de alfafa e de alguns tipos de feijão contaminados com *E. coli* O104:H4, que resultou em mais de 4 mil casos de diarreia, com quase 900 casos de Síndrome Hemolítico-Urêmica e 48 óbitos (CVE, 2011).

A PCRm padronizada neste trabalho apresentou sensibilidade e especificidade satisfatória para detecção de *Salmonella spp.* e dos genes LT e *eae* de *E. coli* em hortaliças orgânicas. O método apresenta-se como uma alternativa com potencial para aplicação na rotina laboratorial, pois pode

reduzir o tempo na obtenção de resultados presuntivos positivos. Além disso, a PCRm padronizada é uma ferramenta de triagem promissora para a detecção dos genes *eae* e *lt* para posterior identificação de outros fatores de virulência de *E. coli*. Pode utilizada em alimentos e em suspensões de bactérias isoladas pelo método convencional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBOMAATY, A. *et al.* Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. **Microbios**, v. 101, p. 181-189, 2000.

BLANCO, M.; *et al.* Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants ( $\mu$ B and  $\text{ER}/\beta$ 2B). **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia Produtiva de Produtos Orgânicos**. Série Agronegócios, v. 5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola – SPA, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA. Janeiro, 2007.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 365–378, July 2003.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica “Profº Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe – NET DTA 2011 - Surto de síndrome hemolítico-urêmica associado à *Escherichia coli* O104:H4, na Alemanha, maio-junho de 2011**. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11\\_ALERTA0507.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/SHU11_ALERTA0507.pdf)>. Acesso em: 20 jan 2012.

DIANA, J.E.; PUI, C.F.; SON, R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. **International Food Research Journal**, v. 19, n.1, p. 51-56, 2012.

DOYLE, M. E. Natural and Organic Foods: Safety Considerations: A Brief Review of the Literature. **Fri Briefings**, Madison, nov. 2006.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, v. 25, p. 705-713, 2008.

ELIZAQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, p. 704-708, 2012.

FAROOQ, S.; *et al.* Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. **Letters in Applied Microbiology**, 48, p. 692–697, 2009.

GALLEGOS-ROBLES, M. A. *et al.* PCR Detection and Microbiological Isolation of *Salmonella* spp. from Fresh Beef and Cantaloupes. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

- GANDRA, E.A. *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GOMEZ-DUARTE, O. G.; BAI, J.; NEWEL, E. Detection of *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* by Three-reaction Multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, n. 1, 2009.
- HOORFAR, J., AHRENS, P., RÅDSTRÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.
- IFOAM. **Growth in Organic Continues**. February 15, 2011. Disponível em: <<http://www.ifoam.org/IFOAMBioFachMediatext-e.pdf>>. Acesso em: 05 set 2011.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 2, p. 122-140, 2004.
- LAIRON, D. Nutritional quality and safety of organic food: A review. **Agronomy For Sustainable Development**, Marseille, 2009.
- MAGKOS, F.; *et al.* Putting the safety of organic food into perspective. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n. 2, 2003.
- McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 399-407, 1997.
- Mercado de Orgânicos**. Disponível em: <[http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agriculturaorganica/integra\\_bia?ident\\_unico=1232](http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agriculturaorganica/integra_bia?ident_unico=1232)>. Acesso em: 20 abril 2011.
- MILES, A. A., MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-748. 1938.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400-1403, 2011.
- OLIVEIRA, S. D. *et al.* Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 217-221, 2003.
- PUI, C.F. *et al.* Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, p. 337-342, 2011.
- QUADRI, F.; SVENNERHOLM, A.; FARUQUE, S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 465–483, July 2005.
- RIVERA, F. P.; *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Peruvian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3198-3203, set. 2010.
- SAEKI, E. K. **Multiplex PCR (PCRm) para detecção e diferenciação de *Salmonella* spp., *S. enteritidis* e *S. typhimurium* em carne de frango**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SANT'ANA, A. S. *et al.* Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1235-1237, 2011.

SANTANA, L. R. *et al.* Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistema de cultivo. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 264-269, 2006.

SEOW, J. *et el.* Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v. 25, p. 39-44, 2012.

SILVA, V. P. B. V. **Análise da conformação de qualidade da alface orgânica certificada produzida no Distrito Federal**. Brasília, 2005. 164f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília – UnB.

STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009. 85f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acesso 12 nov 2011.

WANG, Y.-P. *et al.* Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 328-334, 2009.

XU, Y. *et al.* A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. **Food Control**, v. 25, p. 778-783, 2012

ZHANG, D. *et al.* Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using Multiplex pcr method. **Journal of Food Safety**, v. 29, p 348–363, 2009.

## 5.2 Análise de hortaliças folhosas naturalmente contaminadas pela técnica convencional

A metodologia convencional é preconizada em muitos países como método oficial de diagnóstico de *Salmonella* spp. e *E. coli*, inclusive no Brasil (BRASIL, 2003b). Por esta razão é considerada como método de referência para avaliar o desempenho de novas técnicas de diagnóstico.

Das 102 amostras de hortaliças folhosas orgânicas adquiridas em feiras e avaliadas neste trabalho, 34 (33,3%) estavam contaminadas com *E. coli* (Tabela 5) e *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma amostra. As contagens de *E. coli* variaram de  $10^2$  UFC/g a  $8 \times 10^6$  UFC/g.

**Tabela 5 – Amostras positivas e contagens de *E. coli*.**

Amostras Positivas para <i>E. coli</i>			
Amostra	UFC/g	Amostra	UFC/g
Acelga	$10^3$	Alface	$3 \times 10^6$
Acelga	$2 \times 10^3$	Alface	$4 \times 10^6$
Acelga	$5 \times 10^3$	Alface	$5 \times 10^6$
Acelga	$4 \times 10^4$	Almeirão	$10^3$
Alface	$10^2$	Almeirão	$2 \times 10^3$
Alface	$10^3$	Almeirão	$4 \times 10^3$
Alface	$5 \times 10^3$	Almeirão	$7 \times 10^3$
Alface	$10^4$	Almeirão	$2 \times 10^4$
Alface	$10^4$	Almeirão	$7 \times 10^4$
Alface	$10^4$	Almeirão	$7 \times 10^4$
Alface	$10^4$	Almeirão	$10^5$
Alface	$3 \times 10^4$	Almeirão	$8 \times 10^6$
Alface	$3 \times 10^4$	Espinafre	$8 \times 10^4$
Alface	$5 \times 10^4$	Mostarda	$2 \times 10^2$
Alface	$7 \times 10^4$	Rúcula	$10^3$
Alface	$20 \times 10^4$	Rúcula	$5 \times 10^3$
Alface	$10^5$	Serralha	$8 \times 10^2$

A legislação brasileira, através da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece limites microbiológicos para coliformes termotolerantes e *Salmonella* em hortaliças *in natura*, independente do manejo.

Segundo essa regulamentação, as hortaliças *in natura* podem apresentar até  $10^2$  NMP/g de coliformes termotolerantes, e ausência de *Salmonella* spp.

Abreu *et al.* (2010) não isolaram *Salmonella* spp. de alfaces provenientes de diferentes fontes de adubação orgânica, mas 20% das amostras estavam contaminada com *E. coli*. Estes autores indicam que produtos como tomate, alface, salsinha, couve e sucos de frutas de laranja e de maçã são os mais incriminados em surtos de toxinfecção alimentar em nível mundial, especialmente, por serem fonte de patógenos de significância em saúde pública como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Shigella* spp.

Ao avaliar a qualidade microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza – CE, Bruno *et al.* (2005) verificaram presença de *Salmonella* spp. em 66,6% das amostras de hortaliças. Rodrigues (2007) constatou que, de 30 amostras de alface analisadas em Brasília – DF, duas amostras de alface orgânica apresentaram presença de *Salmonella* spp.

Em trabalho realizado por Silva (2005), foi analisada a conformidade da qualidade microbiológica de alface orgânica certificada e produzida no Distrito Federal e constatou-se que 97% das amostras apresentavam presença de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação. No entanto, o autor não observou presença de *Salmonella* nas amostras analisadas.

Arbos (2010) verificou a presença de *Salmonella* spp. e *E. coli* em amostras de alface orgânica. Balioni *et al.* (2003) analisaram amostras de alface cultivadas sob manejo orgânico na cidade de Campinas - SP e verificaram que 75% das amostras estavam contaminadas por *E. coli*. Nas amostras de alface de diferentes cultivos analisadas por Santana *et al.* (2006), não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. Os autores verificaram também que as amostras de alface provenientes de cultivo orgânico apresentaram maior contagem de coliformes termotolerantes que as amostras de alface convencional e hidropônica.

Leifert *et al.* (2008) analisaram 3200 amostras de vegetais orgânicos e 0,5% estavam contaminadas com *E. coli* em contagens acima de  $10^2$  UFC/g, mas nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp. McMahon

e Wilson (2001) analisaram 85 amostras de hortaliças orgânicas e não detectaram *Salmonella* spp. e *E. coli*. Não foi detectada a presença de *E. coli* em vegetais orgânicos, porém *Salmonella* spp. foi encontrada em 3 amostras, em estudos realizados por Badosa *et al.* (2008). Seow *et al.* (2012) não encontrou *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de vegetais e frutas orgânicas analisadas. Resultados similares foram encontrados por Jahnessen *et al.* (2002) em estudo envolvendo 890 amostras de alface e saladas prontas. Gallegos-Robles *et al.* (2009) encontraram *Salmonella* spp. em quatro amostras de vegetais.

Loncarevic *et al.* (2005) mostraram que *E. coli* O157 e *Salmonella* não foi detectada em amostras de hortaliças folhosas. No entanto, alfaces de manejo orgânico estavam contaminadas com *E. coli* segundo Oliveira *et al.*, 2010b. Nascimento *et al.* (2003) também não detectaram *Salmonella* em vegetais e frutas frescas comercializadas em Campinas, porém, no país como um todo, os relatos encontrados na literatura indicam uma situação variada. Martins *et al.* (2003) encontraram *Salmonella* em quatro de 133 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas comercializadas em São Paulo. Santos *et al.* (2010) também não detectaram *Salmonella* em nenhuma amostra de vegetais minimamente processados, mas 29% das amostras apresentaram contagem de *E. coli* acima de  $10^2$  UFC/g, dentre os vegetais pesquisados, as hortaliças, como alface, rúcula e almeirão, apresentaram maior contaminação.

Alface orgânica e mix de legumes foram analisados quanto a presença de *Salmonella* spp. e *Salmonella* Typhimurium e quatro amostras de alface estavam contaminadas com *Salmonella* spp. (SANT'ANA *et al.*, 2011). *E. coli* foi isolada de 8% das amostras de frutas e hortaliças orgânicas analisadas por MUKHERJEE *et al.* (2004), com uma contagem média de  $10^3$  UFC/g e *E. coli* O157:H7 não foi detectada. *Salmella* spp. foi isolada de amostras de alface e pimentões verdes de cultivo convencional. Entre frutas e vegetais frescos, alface parece ser o mais susceptível a contaminação bacteriana (MUKHERJEE *et al.*, 2004).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram eficientes na amplificação dos fragmentos de DNA de 119 pb do gene *invA* de *Salmonella* spp., 218 pb do gene *lt* de ETEC e 384 pb do gene *eae* de EPEC/EHEC.

A PCRm após a extração do DNA com solução de lise TZ e fervura desenvolvida é uma alternativa rápida, barata, específica e sensível para detecção e identificação de *Salmonella* spp. e de genes importantes na patogenicidade de *E. coli*.

Dada a importância dos surtos de salmonelose e gastroenterites e/ou complicações causadas por *E. coli* diarreiogênicas na saúde pública, este trabalho pode ser utilizado como técnica alternativa para identificação destes micro-organismos a partir de cepas isoladas pelos métodos convencionais e como ferramenta de triagem rápida seguida de confirmação da presença pelo método convencional microbiológico e pela pesquisa de outros fatores de virulência.

Ainda são necessários mais estudos envolvendo a contaminação microbiológica de hortaliças orgânicas, pois um número muito limitado de dados é disponível e estes são insuficientes para afirmar que este tipo de alimento seja mais ou menos seguro que um alimento de manejo convencional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. M. O. **Produtividade e qualidade microbiológica de alface sob diferentes fontes de adubos orgânicos**. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

ABREU, I. M. O. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 (Supl.1), p. 108-118, 2010.

ALBOMAATY, A. *et al.* Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. **Microbios**, v. 101, p. 181-189, 2000.

ALVES, J. **PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ALVES, S. L. C.; NEVES, M. C. P.; COSTA, J. R. Avaliação da Contaminação Microbiológica de Alface Orgânica e Convencional em Diferentes Pontos de Comercialização. **Comunicado Técnico 105 – EMBRAPA Agrobiologia**, 2007.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

ARBOS, K. A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortícolas orgânicas**. 2009. 161f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S. C.; CARVALHO, L. A. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 (Supl.1), p. 215-220, 2010.

AUVRAY, F. *et al.* Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 646–651, 2007.

BADOSA, E. *et al.* Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 605–611, 2008.

BALIONI, G. A. *et al.* Avaliação higiênico-sanitária de alfaces agroecológicas e cultivadas com agrotóxicos, comercializadas na região de Campinas, SP. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 2, p. 73-77, 2003.

BASTOS, P. A. M. **Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:O7 em iogurtes.** 2009. 84f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Veterinária, Bom Jesus do Itabapoana.

BENETTI, T.M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em linguças resfriadas comercializadas no estado do Paraná.** 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BLANCO, M.; *et al.* Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants ( $\mu$ B and  $\text{\textcircled{R}}/\beta$ 2B). **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 007, de 17 de maio de 1999. Normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais.** Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1662>>. Acesso em: 10 ago de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Brasília, 2001.

BRASIL. **Lei n.º 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências.** Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/2003/L10.831.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm)>. Acesso em: 10 ago de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/comsultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=19345>>. Acesso em: 20 jan 2011.

BRUNO, L. M. *et al.* Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2005.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia Produtiva de Produtos Orgânicos**. Série Agronegócios, v. 5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola – SPA, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA. Janeiro, 2007.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1-2, p. 263-278, 1999.

CAMARGO FILHO, W.P.; CAMARGO, F.P.; CAMARGO, A.M.M.P.; ALVES, H.S. Algumas considerações sobre a construção da cadeia de produtos orgânicos. **Informações Econômicas**, v.34, n.2, p.55-69, 2004.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P.J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.18, n.3, p.69-101, 2001.

CASTILLA, K. S. **Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em cadeia de polimerase (PCR)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAVALCANTI, M.P.de.; LORENA, V.M.B.de.; GOMES, Y.M.de. Avanços biotecnológicos para diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Update on multi-state outbreak of *E. coli* O157:H7 infections from fresh spinach, October 6, 2006**. 2006a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborne/ecolispinach/100606.htm>>. Acesso em: 20 fev 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonellosis - outbreak investigation, October 2006**. 2006b. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis\\_2006/110306\\_outbreak\\_notice.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/110306_outbreak_notice.htm)>. Acesso em: 20 fev 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Saintpaul**. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/jalapeno/index.html>>. Acesso em: 20 fev 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation update: multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility.** 2010. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli\\_o145/index.html](http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html)>. Acesso em 15 dez 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***Salmonella*.** 2011a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso em 12 out 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation update: multistate outbreak of human *Salmonella* Enteritidis infections linked to alfalfa sprouts and spicy sprouts.** 2011b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/sprouts-enteritidis0611/070611/index.html>> Acesso em: 18 jan 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas.** CDC, 2011c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/agona-papayas/index.html>>. Acesso em: 18 jan 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* o26 infections linked to raw clover sprouts at Jimmy John's Restaurants.** 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O26-02-12/index.html>>. Acesso em: 18 jan 2012.

CHEN, J. *et al.* A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 168-174, 2010.

CHIA, T. W. R. *et al.* Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, p. 853–859, 2009.

CHIANG, Y. *et al.* Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 110–116, 2012.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 365–378, July 2003.

CONSOLI, M. A. F. *et al.* Estudo introdutório sobre o uso de petrifilm como meio base para a utilização de membrana filtrante na análise de água. **Revista Analytica**, n. 25, 2006.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica “Profº Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Informe – NET DTA 2011 - Surto de síndrome hemolítico-urêmica associado à *Escherichia coli* O104:H4, na Alemanha, maio-junho de 2011.** Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/SHU11\\_ALERTA0507.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/SHU11_ALERTA0507.pdf)>. Acesso em: 20 jan 2012.

DARINI, A.L.C. Métodos epidemiológicos de tipagens de bactérias. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 30, p. 14-19, 1994.

DAROLT, M. R. Comparação da Qualidade do Alimento Orgânico com o Convencional. In: STRIGHETA, P.C & MUNIZ, J.N. **Alimentos Orgânicos: Produção, Tecnologia e Certificação**. 1 ed. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2003, p. 289-312.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the Interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DIANA, J.E.; PUI, C.F.; SON, R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. **International Food Research Journal**, v. 19, n.1, p. 51-56, 2012.

DOYLE, M. E. Natural and Organic Foods: Safety Considerations: A Brief Review of the Literature. **Fri Briefings**, Madison, nov. 2006.

DUNKLEY, K. D. *et al.* Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, p. 26–35, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne. **The EFSA Journal**, v. 9, n.3, p.1-378, 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>>. Acesso em: 14 out 2011.

EHLERS, E. **Agricultura Orgânica: um pouco de história.** Disponível em: <[http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-organica/integra\\_bia?ident\\_unico=1202](http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-organica/integra_bia?ident_unico=1202)>. Acesso em: 20 nov 2011.

ELIZ AQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, v. 25, p. 705-713, 2008.

ELIZ AQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, p. 704-708, 2012.

ELLINGSONA, J. L. E. *et al.* Rapid PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in bovine food products and feces. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 213–217, 2005.

FAO. **Food safety and quality as affected - the status of organic agriculture in Europe**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 03 maio 2011.

FAROOQ, S.; *et al.* Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. **Letters in Applied Microbiology**, 48, p. 692–697, 2009.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: UNITED STATES FOOD DRUG ADMINISTRATION (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8th ed. Gaithersburg, AOAC International, 2002. Chap. 4. p. 4.1-14. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 10 abril 2011.

FERNANDES, S.S. *et al.* *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A. *et al.* Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics. **Food Control**, v. 26, p. 73-78, 2012.

FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 547-553, 2001.

FREITAS, C.G. **Adaptação da técnica de PCR múltipla para a identificação de *Salmonella* spp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium por carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília.

GÁLÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of the a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4338-4349, 1992.

GALDINO, V.M.C.A. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em lotes de galinhas de postura comercial vacinadas e não vacinadas contra *Salmonella* Enteritidis**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

GALLEGOS-ROBLES, M. A. *et al.* PCR Detection and Microbiological Isolation of *Salmonella* spp. from Fresh Beef and Cantaloupes. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

GANDRA, E.A. *et al.* **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** 2006. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GANDRA, E.A. *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GARCIA, J.G.N.; MA, S-F. Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 (Suppl.), 2005.

GIORDANO, S.R.; KRUGLIANSKAS, I. Gestão internacional das redes orgânicas certificadas. **Informações Econômicas**, v.34, n.4, p.45-56, 2004.

GOMEZ-DUARTE, O. G.; BAI, J.; NEWEL, E. Detection of *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* by Three-reaction Multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, n. 1, 2009.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77-87, 2009.

GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White – Kauffmann – Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

HAMERSCHMIDT, I. **Panorama geral: os números da agricultura orgânica hoje destacando o Paraná.** Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabiniberto.htm>>. Acesso em: 05 set 2011.

HOORFAR, J., AHRENS, P., RÅDSTRÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.

IFOAM. **Growth in Organic Continues.** February 15, 2011. Disponível em: <<http://www.ifoam.org/IFOAMBioFachMediatext-e.pdf>>. Acesso em: 05 set 2011.

ISO, 2002 (ISO 6579). **Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for Detection of *Salmonella*.** Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

JOHANNESSEN, G. S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 199-204, 2002.

KAGAMBÈGA, A. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 154-158, 2012.



KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 2, p. 122-140, 2004.

KASNOWSKI, M. C. **Listeria spp., Escherichia coli: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída**. 2004. 85f. Dissertação (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense - Faculdade de Veterinária, Niterói.

KOTTWITZ, L. B. M., OLIVEIRA, T. C. R. M., ALCOGER, I., FARAH, S. M. D. S. S., ABRAHÃO, W. S. M., RODRIGUES, D. D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil **Acta Scientiarum**, v.32, n.1, p.9-15. 2010.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P. K.; THAMPURAN, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 221-226, 2008.

LAIRON, D. Nutritional quality and safety of organic food: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Marseille, 2009.

LEE, S.H. *et al.* A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium and Enteritidis in meats. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 43-51, 2009.

LEIFERT, C.; BALL, K.; VOLAKAKIS, N.; COOPER, J. M. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 931–950, 2008.

LEITÃO, M. F. F. Perigos em produtos agrícolas frescos. In: **Elementos de apoio para as boas práticas agrícolas e sistemas APPCC**. Brasília, DF. CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA, 2006.

LEITE, L.H.M.; WAISSMANN, W. Doenças transmitidas por alimentos na população idosa: Riscos e prevenção. **Revista Ciência Médica**, v. 15, n. 6, p. 525-530, 2006.

LIMA, G. P. P.; VIANELLO, F. Review on the main differences between organic and conventional plant-based foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1-13, 2011.

LONCAREVIC, S.; JOHANNESSEN, G.S.; RORVIK, L.M. Bacteriological quality of organically leaf lettuce in Norway. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 186–189, 2005.

LUNARDON, M.T. **PR: expansão da agricultura orgânica no Estado segue tendência mundial**. Disponível em: [http://www.paginarural.com.br/noticias\\_detalle.php?id=105694](http://www.paginarural.com.br/noticias_detalle.php?id=105694). Acesso em: 08 nov 2011.

MACIOROWSKI, K.G. *et al.* Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 45-53, 2005.

MAGKOS, F.; *et al.* Putting the safety of organic food into perspective. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n. 2, 2003.

MALDONADO, A.G. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e a reação em cadeia pela polimerase –PCR.** 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MALKAWI, H.I.; GHARAIBEH, R. Rapid and Simultaneous identification of two *Salmonella enterica* serotypes, Enteritidis and Typhimurium from chicken and meat products by multiplex PCR. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 44-48, 2004.

MALORNY, B. *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48, 2003.

MALORNY, B., HUEHN, S., DIECKMANN, R., KRÄMER, N., HELMUTH, R. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of *Salmonella* in Food and Feeding Stuff. **Food Analytical Methods**, v.2, p.81-95. 2009.

MARTINS, C. *et al.* Ecologia Microbiana de vegetais folhosos minimamente processados. In: **22º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2003, Florianópolis.

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 23, p. 399-407, 1997.

McMAHON, M. A. S.; WILSON, I. G. The occurrence of enteric pathogens and aeromonas spp. in organic vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 155–162, 2001.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. **Pathogenic *Escherichia coli*.** In: DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. P. 331-341. American Public Health Association, Washington. D. C., USA.

**Mercado de Orgânicos.** Disponível em: <[http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agriculturaorganica/integra\\_bia?ident\\_unico=1232](http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agriculturaorganica/integra_bia?ident_unico=1232)>. Acesso em: 20 abril 2011.

- MICHAELIDOU, N.; HASSAN, L. M. The role of health consciousness, food safety concern. **International Journal Of Consumer Studies**, v. 32, p.163-170, 2008.
- MILES, A. A., MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-748. 1938.
- MUKHERJEE, A.; SPEH, D.; DYCK, E.; DIEZ-GONZALEZ, F. Preharvest Evaluation of Coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Organic and Conventional Produce Grown by Minnesota Farmers. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 894–900, 2004.
- NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, comercializadas no município de Campinas, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 114-115, p. 73-76, 2003.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- O'REGAN, E. *et al.* Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 156, p. 1-11, 2008.
- OLAH, P. A.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Molecular analysis of *Salmonella* isolates recovered from processed turkey carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 845-849, 2005.
- OLIVEIRA, A. B. A. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010a.
- OLIVEIRA, M., *et al.* Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**, v. 27, p. 679–684, 2010b.
- OLIVEIRA, M.; VINÃS, I.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of natural background microbiota on conventional and organic lettuce. **Food Control**, v. 25, p. 678-683, 2012.
- OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400-1403, 2011.
- OLIVEIRA, S. D. *et al.* Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 217-221, 2003.
- OLIVEIRA, W. P. S. **Abordagem dos aspectos biológicos, moleculares, epidemiológicos das infecções e das manifestações clínicas de**

**Samonella Enteritidis**. 2006. 26f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária em Alimentos) – Universidade de Castelo Branco, Brasília.

PEDRO, S. C. M. **Determinação de grupos filogenéticos e pesquisa de genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras de queijo Minas**. 2009. 74f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo – Faculdade de Saúde Publica, São Paulo.

PERRY, L. *et al.* Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **The Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 15, p. 176-198, 2007.

PUI, C.F. *et al.* Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, p. 337-342, 2011.

QUADRI, F.; SVENNERHOLM, A.; FARUQUE, S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 465–483, July 2005.

RIVERA, F. P.; *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Peruvian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3198-3203, set. 2010.

RIYAZ-UI-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333-339, 2004.

RIYAZ-UL-HASSAN, S. *et al.* Application of a **multiplex PCR** assay for the detection of *Shigella*, *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 2, p. 188-194, 2009.

RODRIGUES, C. S. **Contaminação microbiológica em alface e couve comercializadas no varejo de Brasília-DF**. 2007. 29f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília.

SAEKI, E. K. **Multiplex PCR (PCRm) para detecção e diferenciação de *Salmonella* spp., *S. enteritidis* e *S. typhimurium* em carne de frango**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SANT'ANA, A. S. *et al.* Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1235-1237, 2011.

SANTANA, L. R. *et al.* Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistema de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 264-269, 2006.

SANTOS, G.C.; MONTEIRO, M. Sistema orgânico de produção de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p.73-86, 2004.

SANTOS, T. B. A.; SILVA, N. JUNQUEIRA, V. C. A.; PEREIRA, J. L. Indicator microorganisms in minimally processed fruits and vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 2, p. 141-146, 2010.

SCHRANK, I.S. *et al.* Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 45-53, 2001.

SEBRAE / NA. **O que é agricultura orgânica**. Disponível em:<[http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-orgânica/integra\\_bia?ident\\_unico=1211](http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-orgânica/integra_bia?ident_unico=1211)>. Acesso em: 21 maio 2011a.

SEBRAE / NA. **Quem é o consumidor de produtos orgânicos?** Disponível em:< [http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-orgânica/integra\\_bia?ident\\_unico=1231](http://www.sebrae.com.br/uf/espírito-santo/areas-de-atuacao/agro/agricultura-orgânica/integra_bia?ident_unico=1231)>. Acesso em: 21 maio 2011b.

SEOW, J. *et al.* Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v. 25, p. 39-44, 2012.

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

SHELTON, D. R. *et al.* Impact of microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surface waters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, p. 95-101, 2006.

SILVA, C.C. *et al.*, Toxinfecção Alimentar por *Salmonella* em São Paulo/SP. **Boletim Epidemiológico Paulista**, n.1, 2004. Disponível em [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11\\_salmo.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11_salmo.htm). Acesso em: 2010.

SILVA, D.S.P. *et al.* Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1502–1507, 2011.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SILVA, N. da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo, SP: Varela, 2007. 536 p.

SILVA, V. P. B. V. **Análise da conformação de qualidade da alface orgânica certificada produzida no Distrito Federal**. Brasília, 2005. 164f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília – UnB.

STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009. 85f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal.

STRINGHETA, P.C. As leis de produção orgânica no Brasil face às legislações americana, argentina e européia. In: STRINGHETA, P. C. e MUNIZ, J. N. **Alimentos orgânicos: produção, tecnologia e certificação**. Viçosa: Editora UFV, p.331-379, 2003

SU, L.H.; CHIU, C.H. *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acesso 12 nov 2011.

TESSARI, E.N.C. *et al.* Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2557-2560, 2008.

TORRES, A. G.; ZHOU, X. KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v 73, p. 18-29, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Rio de Janeiro. Artmed, 2005.

VAIL, J. H. *et al.* Enumeration of waterborne *Escherichia coli* with petrifilm plates: comparison to standard methods. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, 2003.

VAN ASTEN; VAN DIJK. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 251-259, 2005.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WANG, Y.-P. *et al.* Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 328-334, 2009.

WILLER, H.; KLICHER, L. **The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2009**. Bonn: IFOAM. 286 p. 2009.

WILLER, H.; YUSSEFI, M. **The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2006**. Frick,: International Federation of Organic Agriculture Movements IFOAM. 9 ed. 252 p. 2007

WILLER, H.; YUSSEFI, M. **The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2006**. Frick: International Federation of Organic Agriculture Movements-IFOAM. 213 p. 2006.

WHO - World Health Organization. **Food Safety and Foodborne Illness**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>. Acesso 12 nov 2011.

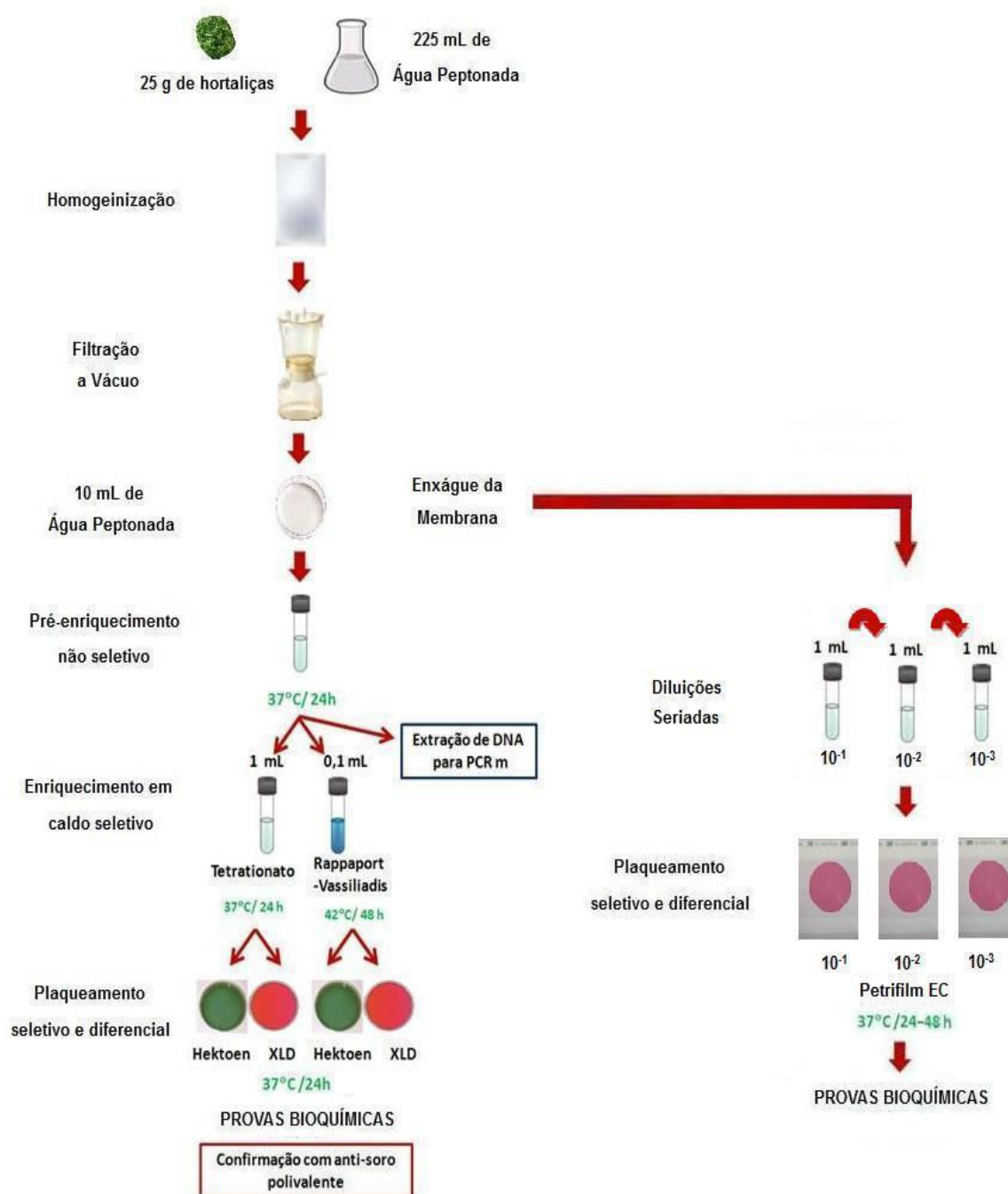
XU, Y. *et al.* A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. **Food Control**, v. 25, p. 778-783, 2012

ZHANG, D. *et al.* Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* o157:h7 in food samples using Multiplex pcr method. **Journal of Food Safety**, v. 29, p 348–363, 2009.

## **ANEXOS**

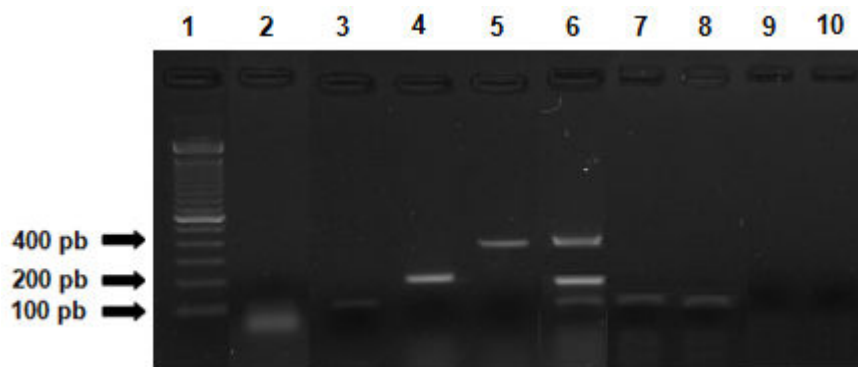


Anexo 1 – Esquema da metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp. e *E. coli* utilizada nas amostras de hortaliças folhosas.



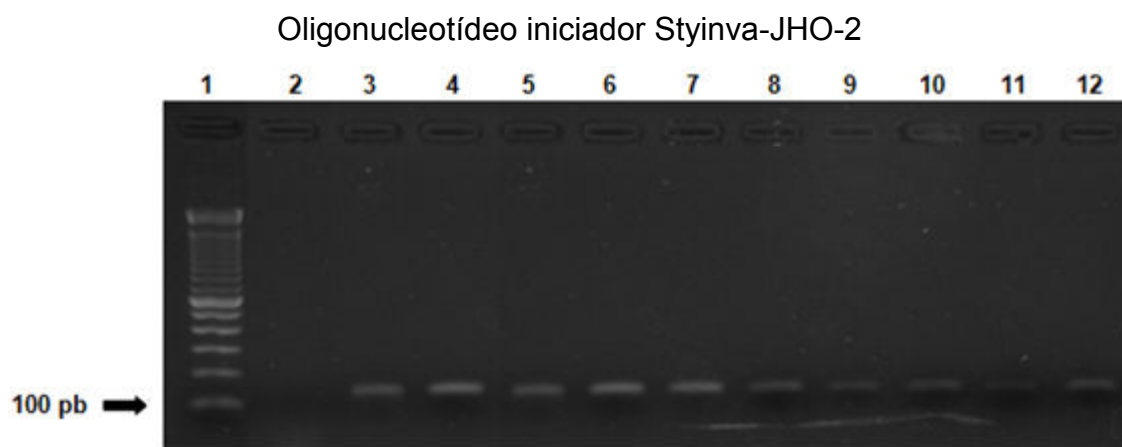
## APÊNDICES

APÊNCIDE A – Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCRm.

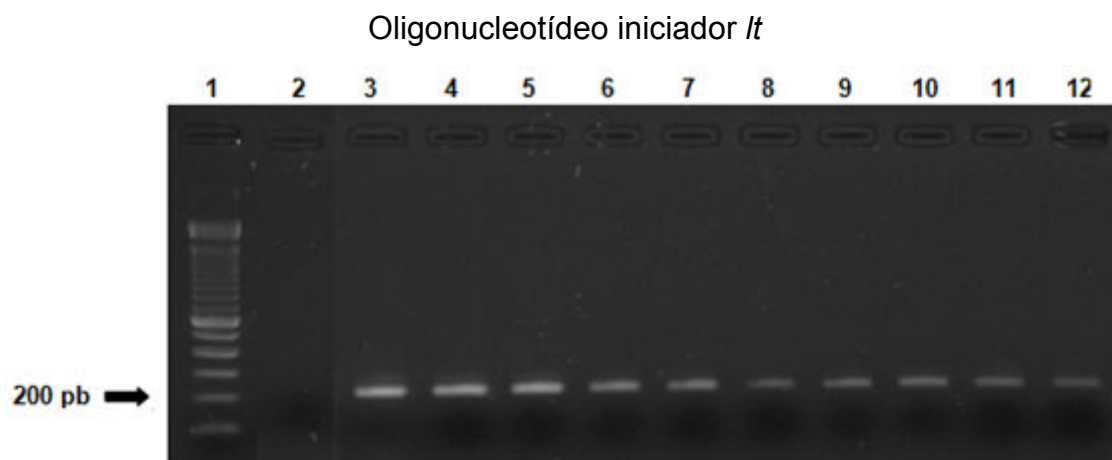


**Figura 2** – Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *Salmonella* spp., ETEC e EPEC. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3) controle positivo para o gênero *Salmonella*; 4) controle positivo de ETEC; 5) controle positivo de EPEC; 6) controle positivo da PCRm; 7-10) algumas das cepas bacterianas utilizadas no teste de especificidade.

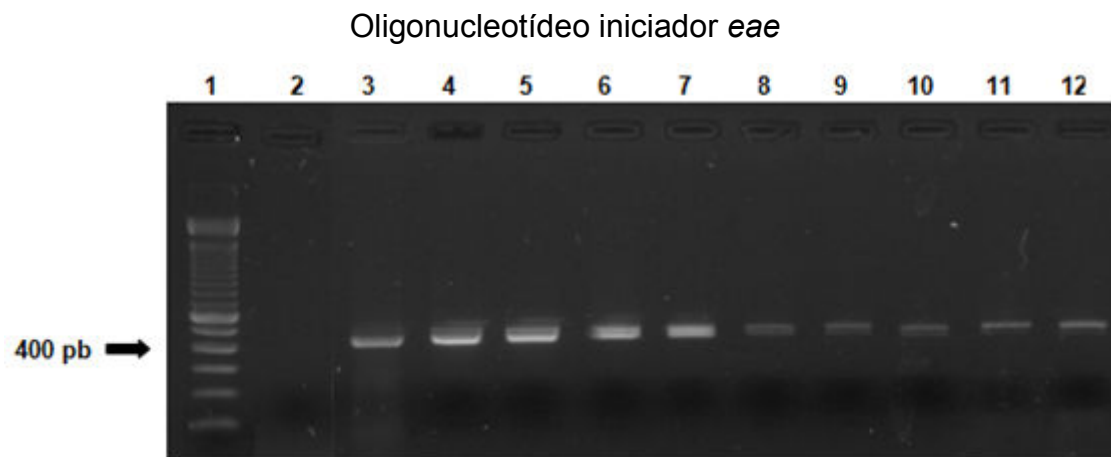
## APÊNDICE B - Limite de detecção do ensaio PCR.



**Figura 3** - Limite de detecção da PCR para identificação de *Salmonella* spp. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-12) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre  $10^9$  a  $10^0$  UFC/mL de *S. Enteritidis* ATCC 13076.

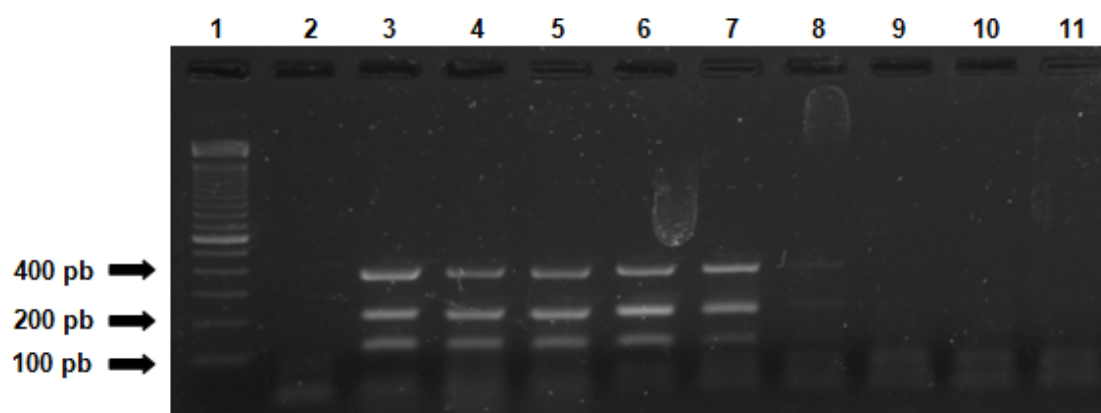


**Figura 4** - Limite de detecção da PCR para identificação de ETEC. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-12) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre  $10^9$  a  $10^0$  UFC/mL de ETEC H10407.



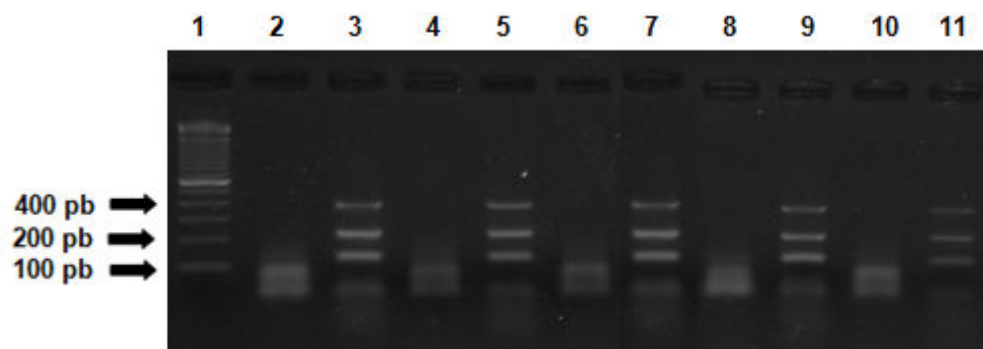
**Figura 5** – Limite de detecção da PCR para identificação de EPEC. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-12) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre  $10^9$  a  $10^0$  UFC/mL de EPEC 2348/69.

## APÊNDICE C - Limite de detecção do ensaio PCRm.

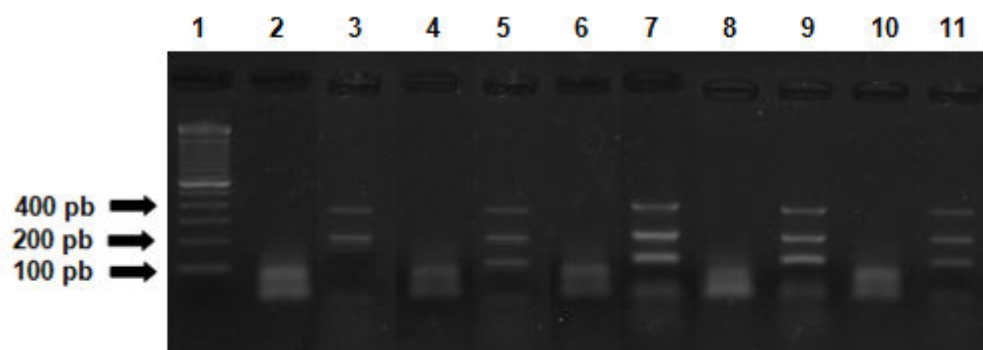


**Figura 6** – Limite de detecção da PCRm para identificação de *Salmonella* spp., ETEC e EPEC. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre  $10^8$  a  $10^0$  UFC/mL de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69.

## APÊNDICE D – PCRm com gradiente de temperatura.



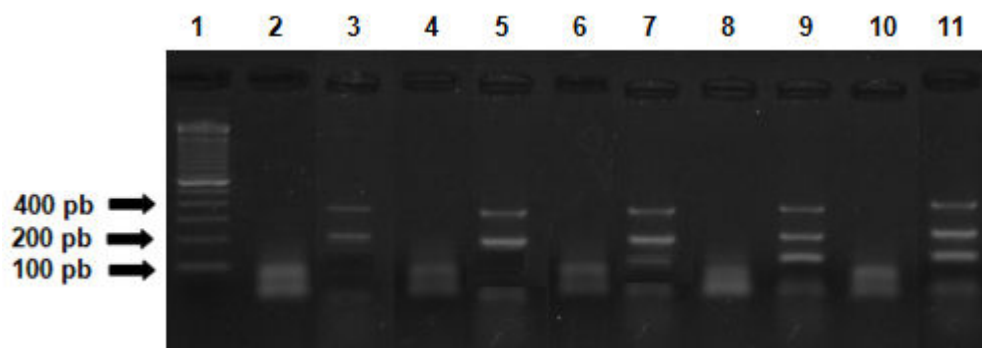
**Figura 7** – Gradiente de temperatura para otimização da PCRm com cepas padrões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2, 4, 6, 8 e 10) controles negativos; 3) PCRm realizada a 55°C; 5) PCRm realizada a 57°C; 7) PCRm realizada a 59°C; 9) PCRm realizada a 60°C; 11) PCRm realizada a 62°C.

**APÊNDICE E – PCRm com gradiente de concentração de magnésio.**

**Figura 8** – Gradiente de concentração de magnésio para otimização da PCRm com cepas padrões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2, 4, 6, 8 e 10) controles negativos; 3) PCRm realizada com 2 mM; 5) PCRm realizada com 3 mM; 7) PCRm realizada com 4 mM; 9) PCRm realizada com 5 mM; 11) PCRm realizada com 6 mM.

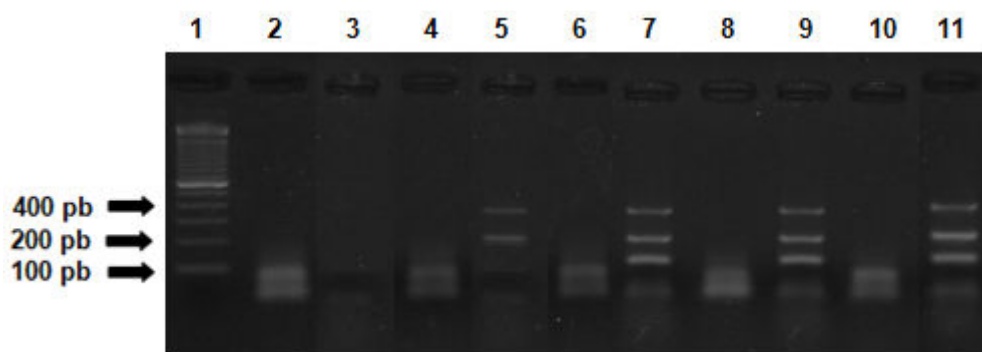


APÊNDICE F – PCRm com gradiente de concentração de oligonucleotídeo iniciador.



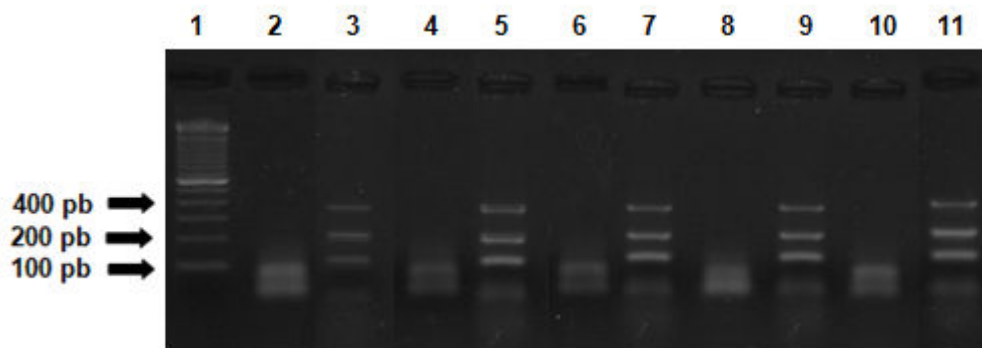
**Figura 9** – Gradiente de concentração de oligonucleotídeo iniciador para otimização da PCRm com cepas padrões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2, 4, 6, 8 e 10) controles negativos; 3) PCRm realizada com 0,2  $\mu$ M; 5) PCRm realizada com 0,3  $\mu$ M; 7) PCRm realizada com 0,4  $\mu$ M; 9) PCRm realizada com 0,5  $\mu$ M; 11) PCRm realizada com 0,6  $\mu$ M.

## APÊNDICE G – PCRm com gradiente de concentração dNTPs.



**Figura 10** – Gradiente de concentração de dNTPs para otimização da PCRm com cepas padrões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2, 4, 6, 8 e 10) controles negativos; 3) PCRm realizada com 0,2 mM; 5) PCRm realizada com 0,3 mM; 7) PCRm realizada com 0,4 mM; 9) PCRm realizada com 0,5 mM; 11) PCRm realizada com 0,6 mM.

APÊNDICE H – PCRm com gradiente de concentração de *Taq* DNA Polimerase.



**Figura 11** – Gradiente de concentração de *Taq* DNA Polimerase para otimização da PCRm com cepas padrões de *S. Enteritidis* ATCC 13076, ETEC H10407 e EPEC 2348/69. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2, 4, 6, 8 e 10) controles negativos; 3) PCRm realizada com 0,5 U; 5) PCRm realizada com 1 U; 7) PCRm realizada com 1,5 U; 9) PCRm realizada com 2 U; 11) PCRm realizada com 2,5 U.