



Aplicação do Colilert[®] à enumeração de *Escherichia coli* em alimentos

Catarina Filipa Peixoto Monteiro de Oliveira

2013



Aplicação do Colilert[®] à enumeração de *Escherichia coli* em alimentos

Catarina Filipa Peixoto Monteiro de Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Maria José Ribeiro Machado Rodrigues e Co-orientação da Mestre Teresa Maria Coelho Baptista

2013

Título: Aplicação do Colilert® à enumeração de *Escherichia coli* em alimentos

Copyright® Catarina Filipa Peixoto Monteiro de Oliveira
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À memória dos meus Avôs e Tio,
à minha Mãe, Pai e Avó

Às minhas Orientadoras

Resumo

O Colilert® (IDEXX) foi concebido para a análise simultânea de coliformes e *E. coli* em amostras de águas e tem sido bastante usado em análise de rotina de águas potáveis, de piscinas, doces, costeiras e até residuais. O presente trabalho pretendeu aplicar este método à enumeração de *E. coli* em diferentes matrizes alimentares, através de comparação de resultados com o método de referência em alimentos (ISO 16649-2, 2001). Assim, o ensaio foi dividido em três fases.

A primeira fase consistiu em observar a possibilidade de utilização do método Colilert® na análise de *E. coli* em alimentos com características variadas. De dez alimentos diferentes estudados, selecionaram-se os seguintes: bolo com creme, carne de porco picada crua, sopa “caldo-verde”, salada de vegetais crus (alface e cenoura) e iogurte natural sólido. Estes foram aprovados pois possibilitaram superior posicionamento da amostra na *tray*, uma cor dos poços mais clara e melhor leitura dos resultados com luz UV.

Na segunda fase, o Colilert® demonstrou ser um método exato quando os alimentos foram artificialmente contaminados com cerca de 2 log/g de *E. coli* (ATCC 25922). As contagens obtidas com o Colilert® foram semelhantes às obtidas com o método de referência.

Na última fase, o Colilert® permitiu recuperar *E. coli* naturalmente presente em carne picada de porco crua exposta a - 18° C durante 16 horas, tendo demonstrado menor limite de detecção que o método de referência. Nesta fase, o Colilert® conseguiu recuperar *E. coli* em pequeno número, como 1 microrganismo/g, ao contrário do método de referência.

Neste estudo, o Colilert® não apresentou resultados falso-positivos nem falso-negativos. No entanto, a leitura foi dificultada pelo aparecimento de poços com fluorescência verde nas amostras de carne picada de porco crua. O método demonstrou ser um método fácil e rápido, mas pouco objetivo e menos económico que o método de referência.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Métodos clássicos; Métodos alternativos; Detecção enzimática; Inovação; Análise de água; Colilert®; Análise alimentar.

Abstract

Colilert® (IDEXX) was originally developed for the simultaneous enumeration of coliforms and *E. coli* in water samples and has been used for the quality control routine of drinking, swimming pools, fresh, coastal and waste waters. The present project aimed to apply Colilert® to the enumeration of *E. coli* in different food matrices, through the comparison of results against the reference method for *E. coli* food analysis (ISO 16649-2, 2001). Thus, the study was divided in three stages.

During the first stage ten different types of foods were analyzed with Colilert®. From these it were approved the following: cake with custard; raw minced pork; soup "caldo-verde"; raw vegetable salad (lettuce and carrots) and solid yogurt. The approved foods presented a better insertion in the tray, the colour of the wells was lighter and the UV reading was easier.

In the second stage the foods were artificially contaminated with about 2 log/g of *E. coli* (ATCC 25922) and analyzed. Colilert® proved to be an accurate method and the counts were similar to the ones obtained with the reference method.

In the third and last stage, Colilert® allowed the recovery of *E. coli* naturally contained in raw minced pork after exposure to - 18° C during 16 hours, and presented a lower detection limit. Using the Colilert® method it was feasible to recover *E. coli* present in very low numbers, as for example, 1 microorganism/g, opposed to the reference method.

In the present study, the Colilert® method did not revealed neither false-positive or false-negative results, however sometimes the analysis was difficult to perform due to the presence of green fluorescence in some wells of raw minced pork samples. Generally Colilert® was an easy and rapid method, but less objective and more expensive than the reference method.

Key-words: *Escherichia coli*; Classic methods; Alternative methods; Enzymatic detection; Innovation; Water analysis; Colilert®; Food analysis.

Agradecimientos

À Professora Maria José Rodrigues, minha orientadora da dissertação, que com toda a sua paciência inesgotável, apoio e dedicação incansável, incentivo contínuo e persistente e todo o rigor científico, contribuiu para conclusão deste trabalho.

À Professora Teresa Baptista, minha co-orientadora, que com uma enorme disponibilidade e simpatia me apoiou neste projeto.

À Escola Superior de Tecnologia do Mar integrada no Instituto Politécnico de Leiria por ter providenciado todos os recursos necessários para a execução e conclusão dos objetivos do presente trabalho, como a disponibilização de equipamentos, reagentes e material de laboratório.

Ao Laboratório de Medicina Veterinária de Santarém por me ter aceite nas suas instalações e ter colocado todos os recursos á disposição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Engenheira Alexandra Cardigos, responsável do Departamento de Microbiologia Alimentar, e técnicas de laboratório pela amizade, simpatia e apoio.

À família e amigos pela paciência e força demonstrada nos momentos mais difíceis.

Abreviaturas e Símbolos

As abreviaturas e símbolos utilizados são aqui apresentadas por ordem alfabética seguidos da correspondente definição. As abreviaturas são também explicadas (entre parêntesis) a primeira vez que aparecem no texto e são legendadas quando aparecem em tabela. Certas abreviaturas foram mantidas na forma em que são reconhecidas internacionalmente e em algumas inclui a tradução.

| Abreviatura/Símbolo | Definição |
|----------------------------|--|
| ° C | Graus Célcus |
| % | Percentagem |
| € | Euro |
| $\sum a$ | Soma da contagem de UFC em todas as placas de duas diluições sucessivas nas quais uma, pelo menos, tem que conter no mínimo 15 UFC azuis |
| µm | Micrómetros |
| < | Inferior |
| ≥ | Igual ou superior |
| ± | Mais ou menos |
| ✓ | Cumpre |
| X | Não cumpre |
| ----- | Não apresenta contagens |
| 4-MU | 4-metil-umbeliferona |
| 7-AMC | 7-amino-4-metilcumarina |
| 8HQG | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucuronídeo |
| ANOVA | Análise de variância |
| ANS | 8-anilino-1-naftalenossulfico |
| AO | Acridina Orange |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| a_w | Atividade da água |
| BCIG | 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronídeo |
| BGB | Brilliant Green Bile |

| | |
|-------------------|---|
| C | Carbono |
| Ca | Cálcio |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| CD-EC | Compact Dry [®] <i>E. coli</i> |
| Co | Cobalto |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| Cu | Cobre |
| <i>d</i> | Fator de diluição correspondente à primeira diluição do inoculo [<i>d</i> = 1 no caso de produtos líquidos em que a amostra é diretamente inoculada] |
| DST | Defined Substrate Technology = Tecnologia do substrato definido |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EAEC | <i>E. coli</i> enteroagregativa |
| EHEC | <i>E. coli</i> enterohemorrágica |
| EIEC | <i>E. coli</i> enteroinvasora |
| EN | European norm = Norma Europeia |
| EPEC | <i>E. coli</i> enteropatogénica |
| ETEC | <i>E. coli</i> enterotoxigénica |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FDGlcU | Fluorescein-di-β-D-glucuronídeo |
| Fe | Ferro |
| FM | Fermentação por membrana |
| FTM | Fermentação dos tubos múltiplos |
| g | Gramma |
| GAL | β-galactosidase |
| GUD | β -D-glucuronidase |
| H | Hidrogénio |
| H ₂ O | Água |

| | |
|-----------------------------------|---|
| H ₂ S | Sulfato de hidrogénio |
| ICMSF | International Commission on Microbiological Specifications of Foods = Comissão Internacional para as Especificações Microbiológicas dos Alimentos |
| ISO | International Organization for Standardization = Organização Internacional para Padronização |
| K | Potássio |
| KH ₂ PO ₄ | Hidrogenofosfato de potássio |
| KNO ₃ | Nitrato de potássio |
| L | Litro |
| LMV | Laboratório de Medicina Veterinária |
| log | Logaritmo de base decimal |
| LST | Lauril Sulphate Triptose |
| Magenta-GAL | 5-bromo-6-cloro-3-indol β-D-galactopiranosídeo |
| mg | Miligrama |
| Mg | Magnésio |
| MgSO ₄ | Sulfato de manganês |
| mL | Mililitro |
| Mn | Manganês |
| Mn(SO ₄) ₂ | Sulfato de manganês |
| n ₁ | Número de placas inoculadas na primeira diluição |
| n ₂ | Número de placas inoculadas na segunda diluição |
| N | Azoto |
| NA | Não aplicável |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato disódico |
| Na ₂ SO ₃ | Sulfito de sódio |

| | |
|-------------------|---|
| NMKL | Nordic Committee on Food Analysis = Comité Nordico para a Análise a Alimentos |
| NMP | Número mais provável |
| NP | Norma Portuguesa |
| ONP | o-nitrofenóis |
| ONPG | Ortonitrofenil-β-D-galactopiranosídeo |
| p | Nível de significância |
| P | Fósforo |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Petrifilm™ EC | Petrifilm™ <i>E. coli</i> and Coliforms Count Plates |
| PNP | p-nitrofenóis |
| PO ₄ | Fosfato |
| Tray | Quanti-Tray®/2000 |
| REBECA® | Rapid Enterobacteria <i>Escherichia Coli</i> Coliform Ágar |
| S | Enxofre |
| Simplate® CEC | Simplate® Coliform/ <i>E. coli</i> |
| SO | Dióxido de enxofre |
| SO ₄ | Sulfato |
| STEC | Produtoras de toxina Shiga de <i>E. coli</i> |
| TBX | Tryptone-Bile X-glucuronídeo |
| UFC | Unidade formadora de colónias |
| USEPA | United States Environmental Protection Agency |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volume de inóculo, em mL, inserido em cada placa |
| VRB | Violet Red Bile |
| Zn | Zinco |
| ZnSO ₄ | Sulfato de zinco |

Índice

| | |
|--|-------|
| Resumo | v |
| Abstract | ix |
| Agradecimentos..... | xiii |
| Abreviaturas e Símbolos..... | xvii |
| Índices | xxiii |
| Índice Geral | xxv |
| Índice de Figuras | xxvii |
| Índice de Tabelas | xxix |
| 1.Introdução..... | 1 |
| 1.1. Características principais de <i>Escherichia coli</i> | 3 |
| 1.1.1. Crescimento e sobrevivência de <i>E. coli</i> | 4 |
| 1.2. <i>E. coli</i> como indicador de qualidade..... | 5 |
| 1.3. Metodologias clássicas de enumeração de <i>E. coli</i> em alimentos | 8 |
| 1.4. Detecção enzimática como método alternativo na enumeração de <i>E. coli</i> em alimentos..... | 11 |
| 1.5. Inovações na detecção enzimática aplicada á enumeração de <i>E. coli</i> em alimentos..... | 14 |
| 1.6. Colilert®..... | 21 |
| 2. Objetivos..... | 23 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 25 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 25 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 27 |
| 3.1. Fases do trabalho prático..... | 29 |
| 3.2. Local de estudo e preparação da amostra | 29 |
| 3.3. Métodos Microbiológicos de análise..... | 29 |
| 3.3.1. Método alternativo Colilert®-18..... | 30 |
| 3.3.1.1. Confirmação de resultados positivos e negativos..... | 31 |
| 3.3.2. Método de referência (ISO 16649-2, 2001) | 32 |
| 3.4. Fase 1: Versatilidade do Colilert® | 33 |
| 3.5. Fase 2: Exatidão do método Colilert® | 33 |
| 3.5.1. Estudo Preliminar..... | 33 |
| 3.5.2. Contaminação artificial..... | 34 |
| 3.6. Fase 3: Recuperação de <i>E. coli</i> em alimentos congelados | 34 |
| 3.7. Análise estatística | 35 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Fase 1: Observação da versatilidade do método Colilert® e seleção dos produtos alimentares..... | 39 |
| 4.2. Fase 2: Apreciação da exatidão do método Colilert® | 45 |
| 4.3. Fase 3: Observação da recuperação de <i>E. coli</i> naturalmente presente em alimentos..... | 48 |
| 4.4. Aspectos gerais do método Colilert® | 51 |
| 4.4.1. Confirmação de resultados | 51 |
| 4.4.2. Comparação entre meios de cultura | 52 |
| 4.4.3. Vantagens e desvantagens..... | 55 |
| 4.4.4. Análise de custos..... | 57 |
| 5. Conclusão..... | 61 |
| 6. Perspetivas Futuras | 65 |
| 7. Bibliografia | 69 |
| 8. Anexos..... | 89 |
| Anexo I | 91 |
| Anexo II | 95 |
| Anexo III | 97 |

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Colónias características de <i>E. coli</i> (azuis com gás) e coliformes (vermelhas com gás) numa placa de Petrifilm™ EC..... | 16 |
| Figura 2 – Colónias características de <i>E. coli</i> (azuis) numa placa <i>Rida</i> ® <i>Count E. coli</i> | 17 |
| Figura 3 – Colónias características de <i>E. coli</i> (azuis) e coliformes (rosas) numa placa de CD-EC | 18 |
| Figura 4 - Colónias características de <i>E. coli</i> (azuis) e coliformes (laranja a roxo) numa placa de CEC | 19 |
| Figura 5 – Poços fluorescentes positivos de <i>E. coli</i> no método TEMPO® EC..... | 20 |
| Figura 6 – a) Pipetagem de 100 mL de amostra através do filtro do <i>BagFilter</i> . b) Transferência de 100 mL de amostras para o frasco de Shott com volume máximo de 100 mL | 30 |
| Figura 7 – a) Colilert®-18. b) Adição do meio de cultura Colilert-18® aos 100 mL de amostra. c) Mistura amostra/reagente em repouso. d) Reagente <i>Antifoam Solution</i> para o desaparecimento de espuma..... | 30 |
| Figura 8 - a) Transferência da mistura amostra reagente para a <i>tray</i> . b) Colocação da <i>tray</i> cheio no suporte de borracha.. | 31 |
| Figura 9 - a) Placa a selar a quente no Quanti-Tray® Sealer. b) Placas seladas e prontas a incubar. c) Placas na estufa de 35 ± 0,5°C. | 31 |
| Figura 10 - a) Poços pequenos e poços grandes azuis fluorescentes de <i>E. coli</i> sob luz UV (366 nm). b) Diferença de poços positivos e poços negativos de <i>E. coli</i> | 31 |
| Figura 11 - Poços presumíveis de presença de <i>E. coli</i> assinalados com uma seta preta, após a perfuração dos mesmos com ansa..... | 32 |
| Figura 12 - Fórmula de cálculo apresentada na ISO 16649-2 (2001) para a enumeração de <i>E. coli</i> GUD positiva. | 32 |
| Figura 13 – a) <i>Tray</i> da carne picada de porco antes da incubação com poços amarelos característicos de coliformes. b) <i>Tray</i> da carne picada de porco depois da incubação com poços fluorescentes (com pouco brilho) característicos de <i>E. coli</i> | 40 |
| Figura 14 – a) <i>Trays</i> antes da incubação diluídos em <i>Buffered Peptone Water</i> apresentavam cores mais escuras em comparação com as <i>trays</i> diluídos em <i>Peptone Water</i> 0,1%. b) <i>Trays</i> depois da incubação diluídos em <i>Buffered Peptone Water</i> apresentavam cores um pouco mais escuras em comparação com as <i>trays</i> diluídas em <i>Peptone Water</i> 0,1%. c) <i>Trays</i> antes da incubação apresentavam cores muito claras/suaves diluídos <i>Peptone Water</i> a 0,1% em comparação com as <i>trays</i> diluído em <i>Buffered Peptone Water</i> . d) <i>Trays</i> depois da incubação diluídos em <i>Peptone Water</i> 0,1% apresentavam cores mais claras/suaves em comparação com as <i>trays</i> diluídos em <i>Buffered Peptone Water</i> | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 – Poços indicadores da presença de <i>E. coli</i> (em carne de porco picada) através da fluorescência particularmente perceptível e notória dos restantes | 41 |
| Figura 16 – a) <i>Tray</i> da sopa caldo-ver antes da incubação. b) <i>Tray</i> da sopa caldo-verde após a incubação..... | 42 |
| Figura 17 - a) <i>Tray</i> do iogurte sólido natural antes da incubação. b) <i>Tray</i> do iogurte sólido natural após a incubação..... | 42 |
| Figura 18 - a) <i>Tray</i> do salmão antes da incubação. b) <i>Tray</i> do salmão após a incubação. | 42 |
| Figura 19 - a) <i>Tray</i> do bacalhau com natas antes da incubação. b) <i>Tray</i> do bacalhau com natas após a incubação | 42 |
| Figura 1A - Preparação da suspensão-mãe e método Colilert®-18..... | 91 |
| Figura 1B - Preparação da suspensão-mãe e método de referência: ISO 16649-2, 2001..... | 92 |
| Figura 1C - Fase 2: Estudo de exatidão do método Colilert® | 93 |
| Figura 1D - Fase 3: Recuperação de <i>E. coli</i> em alimentos congelados..... | 94 |

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação científica de <i>E. coli</i> | 3 |
| Tabela 2 – Quadro clínico dos sintomas observados em cada grupo patogénico de <i>E. coli</i> | 4 |
| Tabela 3 - Definição de indicador e microrganismos índice e modelo..... | 6 |
| Tabela 4 - Categoria de produtos com obrigatoriedade da análise de <i>E. coli</i> , como indicador de falta de higiene nos processos | 8 |
| Tabela 5 - Substratos cromogénicos usados com mais frequência..... | 12 |
| Tabela 6 - Alguns substratos cromogénicos e fluorogénicos que podem ser empregues para a deteção de <i>E. coli</i> | 13 |
| Tabela 7 – Exemplos de meios de cultura para a enumeração de <i>E. coli</i> em alimentos, para além do TBX..... | 13 |
| Tabela 8 – Exemplos de meios de cultura onde o MUG pode ser incorporado | 14 |
| Tabela 9 – Produtos comerciais baseados na contagem de UFC..... | 15 |
| Tabela 10 – Produtos comerciais baseados no método do NMP | 15 |
| Tabela 11 – Constituintes do meio de cultura Petrifilm™ EC | 16 |
| Tabela 12 – Condições de incubação dos métodos mais comuns usados para a enumeração de <i>E. coli</i> pelo Petrifilm™ EC..... | 16 |
| Tabela 13 - Constituintes dos meios de cultura <i>Rida</i> ® <i>Count E. coli</i> | 17 |
| Tabela 14 - Constituintes do meio de cultura CD-EC..... | 17 |
| Tabela 15 – Métodos de cultura modificados para a enumeração de <i>E. coli</i> | 20 |
| Tabela 16 – As 3 fases do estudo laboratorial. | 29 |
| Tabela 17 - Aspectos considerados para avaliar a versatilidade e funcionalidade do método Colilert® em produtos alimentares. | 33 |
| Tabela 18 - Categorias de produtos alimentares e os respetivos produtos sujeitos à seleção na fase 1..... | 33 |
| Tabela 19 – Constituição da <i>Buffered Peptone Water</i> | 39 |
| Tabela 20 - Constituição da <i>Peptone Water</i> | 40 |
| Tabela 21 - Alimentos avaliados para análise com o método Colilert®..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Tabela 22 – Resultados obtidos pelo método Colilert® e método de referência em produtos alimentares contaminados artificialmente no estudo de exatidão. | 45 |
| Tabela 23 - Resultados obtidos pelo método Colilert® e método de referência em produto alimentar naturalmente contaminado | 49 |
| Tabela 24 - Principais elementos, suas fontes e funções em células bacterianas..... | 54 |
| Tabela 25 - Composição do meio de cultura Colilert® | 55 |
| Tabela 26 – Composição do meio de cultura TBX ágar. | 55 |
| Tabela 27 - Custos da análise efetuada pelo método de referência de enumeração de <i>E. coli</i> | 58 |
| Tabela 28 - Custos da análise efetuada pelo método rápido de enumeração de <i>E. coli</i> , o Colilert®-18..... | 58 |
| Tabela 3A - Estimativa de custos do método de referência..... | 97 |
| Tabela 3B - Estimativa de custos do método Colilert®..... | 97 |

Introdução

1.1. Características principais de *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), cuja classificação científica se encontra descrita na Tabela 1, foi originalmente conhecida como *Bacterium coli commune*, e identificada em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich (Escherich, 1885; Shulman *et al.*, 2007). Originalmente tal nome foi atribuído por se encontrar presente nas fezes dos pacientes examinados (Kornacki e Johnson, 2001; Jay *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Classificação científica de *E. coli* (Coulliette, 2008).

| Classificação Científica | |
|--------------------------|-------------------------|
| Reino | Bactéria |
| Filo | Proteobacteria |
| Classe | Gamma proteobacteria |
| Ordem | Enterobacteriales |
| Família | Enterobacteriaceae |
| Gênero | <i>Escherichia</i> |
| Espécie | <i>Escherichia coli</i> |

E. coli é um coliforme, ou seja, uma enterobactéria com forma de bastonete, Gram-negativa, não produtora de esporos e fermentadora da lactose com produção de ácido e gás no período de 24 - 48 horas a 35 - 37° C (Rompre *et al.*, 2002; Winfield e Groisman, 2003; Sondia e Salopek-Sondi, 2004; Mehdipour *et al.*, 2012; Darmawati *et al.*, 2013; Ting *et al.*, 2013). Adicionalmente, *E. coli* é um coliforme termotolerante e possui a capacidade de fermentar a lactose a temperaturas de 44 - 45° C, característica que a distingue de outros coliformes e enterobactérias (Rompre *et al.*, 2002). As suas células exibem cerca de 1,5 µm (micrómetros) de comprimento e 0,5 - 0,6 µm de diâmetro com um volume da célula de 0,65 µm³, aproximadamente (Santarella-Mellwig *et al.*, 2013). É um microrganismo anaeróbio facultativo que se encontra largamente distribuído no intestino dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, mas algumas, como o serótipo O157:H7, podem causar graves intoxicações alimentares no Homem (Clermont *et al.*, 2000; Hudault *et al.*, 2001; Zogaj *et al.*, 2003; Jay *et al.*, 2005; Vogt e Dippold, 2005). As estirpes inofensivas fazem parte da flora normal do intestino e são benéficas para o seu hospedeiro, através da produção de vitamina K2 ou impedindo o estabelecimento de bactérias patogénicas no interior do intestino. Só em casos muito raros podem tornar-se uma ameaça a indivíduos sãos. Tal pode acontecer, em pacientes com imunodeficiências ou após uma rutura traumática entre o intestino e outros locais estéreis do corpo ou após intervenções cirúrgicas (Kuhnert *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001; Vogt e Dippold, 2005).

As estirpes de *E. coli* patogénicas têm sido classificadas em duas grandes categorias: (i) os patogénicos entéricos; (ii) e os patogénicos extra-intestinais. Estes últimos são responsáveis por infeções do trato urinário em todos os grupos etários e meningite em crianças e animais jovens (Kuhnert *et al.*, 2000). Os entéricos são classificados com base em características sorológicas e propriedades virológicas (Rendón *et al.*, 2007). Estão divididos em: (i) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); (ii) *E. coli* enteropatogénica (EPEC); (iii) produtoras de toxina Shiga de *E. coli* (STEC); (iv) *E. coli* enteroinvasora (EIEC); (v) *E. coli* enteroagregativa (EAEC); (vi) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Os sintomas causados no Homem por cada grupo patogénico encontram-se descritos na Tabela 2 (Cerna-Cortes *et al.*, 2013; Gómez-Aldapa *et al.* 2013, Kim *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Quadro clínico dos sintomas observados em cada grupo patogénico de *E. coli* (Feng *et al.*, 2002; Okhuysen e DuPont, 2010; Suardana *et al.*, 2012; Razzaq *et al.*, 2013). ETEC - *E. coli* enterotoxigénica; EPEC - *E. coli* enteropatogénica; STEC - produtoras de toxina Shiga de *E. coli*; EIEC - *E. coli* enteroinvasora; EAEC - *E. coli* enteroagregativa; EHEC - *E. coli* enterohemorrágica.

| <i>E. coli</i> patogénica | Sintomatologia |
|--------------------------------------|--|
| ETEC | <ul style="list-style-type: none"> • Provoca diarreia frequentemente em crianças de países menos desenvolvidos e em visitantes de países desenvolvidos. • Gastroenterite é o nome mais comum da doença, embora também possa ser conhecida como “diarreia de viajantes”. • Sintomas: diarreia, cólicas abdominais, febre baixa, náuseas e mal-estar. |
| EPEC | <ul style="list-style-type: none"> • Provoca diarreia em pessoas de países em desenvolvimento, especialmente em crianças com menos de 2 anos de idade. • Sintomas: diarreia aquosa, vômitos e febre baixa. • Desequilíbrio do sistema de absorção de nutrientes é causado pela aderência à mucosa intestinal. |
| STEC | <ul style="list-style-type: none"> • Produção de toxinas Shiga. • Representa perigo para as crianças de países em desenvolvimento. • Sintomas: diarreia com ou sem sangue, colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urémica. |
| EIEC | <ul style="list-style-type: none"> • Todas as populações são suscetíveis a infeções. • Sintomas: disenteria leve, cólicas abdominais, diarreia, vômitos, febre, calafrios, mal-estar generalizado e fezes que podem conter sangue e muco. |
| EAEC | <ul style="list-style-type: none"> • Diarreia aguda e persistente, que acontece em crianças de países em desenvolvimento e viajantes provenientes de países desenvolvidos. • Inflamação crónica, desnutrição e diminuição do desenvolvimento físico e intelectual em crianças. |
| EHEC | <ul style="list-style-type: none"> • Infeções podem variar de diarreia a complicações graves. • Sintomas: colite hemorrágica (caracterizada por cólicas severas, dor abdominal), náuseas ou vômitos, diarreia com ou sem sangue e febre baixa ou ausente. • Crianças e idosos são mais suscetíveis de obterem colite hemorrágica. • O membro mais famoso é <i>E. coli</i> O157:H7. |

1.1.1. Crescimento e sobrevivência de *E. coli*

A fim de detetar/quantificar e controlar *E. coli* é necessário conhecer os fatores que estimulam e inibem o seu crescimento. O crescimento e sobrevivência de *E. coli* são dependentes de uma série de parâmetros ambientais intrínsecos e extrínsecos ao alimento. Parâmetros intrínsecos podem ser definidos como as propriedades que são inerentes ao alimento, tais como o pH, atividade de água (a_w), e o tipo/teor de nutrientes. Enquanto, os parâmetros extrínsecos são aqueles relacionados com o ambiente de armazenamento do alimento, como a atmosfera, a temperatura, a humidade, entre outros (Kocharunchitt, 2012). Para qualquer parâmetro ambiental as células bacterianas são capazes de crescer apenas ao longo de um intervalo limitado, o que pode ser caracterizado por limites superiores e inferiores para o crescimento, bem como o nível ótimo para a taxa de crescimento (Jay, 2000). As alterações nas condições ambientais

podem ter um impacto significativo sobre o crescimento e a sobrevivência de bactérias. Para se adaptarem a essas mudanças ambientais, as bactérias têm evoluído a capacidade para induzir uma resposta ao *stress*. Esta resposta ao *stress* permite às células bacterianas a proteção dos processos vitais (Aertsen e Michiels, 2004; Chung *et al.*, 2006; Giuliadori *et al.*, 2007).

A relação entre o crescimento bacteriano e a temperatura foi investigada em detalhe por exemplo, por Heitzer *et al.* (1991) e Zwietering *et al.* (1991). *E. coli* ao ser uma bactéria mesófila cresce a temperaturas entre 20° C e 45° C, apresentando um crescimento ótimo entre 30° C e 40° C. Porém, pode crescer e sobreviver a temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas em comparação com outras bactérias mesófilas, como demonstra um estudo efetuado por Murata *et al.* (2011). Sendo assim, *E. coli* é capaz de manter um crescimento equilibrado de 8° C a 49° C com um valor ótimo de crescimento nos 37° C. A taxa de crescimento fica mais lenta a temperaturas acima de 40° C ou a temperaturas abaixo de 20 ° C (Jay, 2000).

E. coli é frequentemente considerada uma bactéria neutrófila, porque cresce melhor em pH neutro (pH = 7) (Hughes *et al.*, 2007). Embora também possa crescer em meio ácido ou básico, gama de pH entre 4,4 a 9,0, com taxas de crescimento semelhantes em pH entre 5,5 e 7,5 (Jay, 2000). Foi relatado que pode sobreviver inalterada de 2 horas a 7 horas após a exposição a um pH de 2,5 (Kocharunchitt, 2012). A tolerância de *E. coli* a condições de pH mais extremas é fundamental para a sua sobrevivência, uma vez que esta bactéria está sujeita à acidez extrema do estômago e à basicidade do intestino. Exemplo dessa tolerância é a capacidade da *E. coli* de sobreviver a um pH tão baixo como 2 e tão elevado como 10 por várias horas (Hughes *et al.*, 2007).

A a_w para o crescimento *E. coli* varia de 0,950 - 0,999 com um crescimento ideal de 0,995 (Lake *et al.*, 2002).

1.2. *E. coli* como indicador de qualidade

Tradicionalmente, os microrganismos indicadores foram usados apenas para sugerir a presença de patogênicos (Tortorello, 2003). No entanto, os microrganismos indicadores podem também ter outras funções como, assinalar um lapso de boas práticas e/ou uma falha no processo de fabrico de um alimento (Odonkor e Ampofo, 2013). Mas de um modo geral, os microrganismos indicadores são bactérias de qualquer grupo taxonómico, fisiológico ou ecológico, utilizadas como um sinal de qualidade, estado de higiene e segurança em alimentos, água ou ambiente (ICMSF, 2000).

A seleção de um indicador deve ser realizada com cuidado a fim de se interpretar devidamente os resultados dos testes do indicador. O indicador deve ser sempre avaliado em contexto apropriado, tendo em conta fatores intrínsecos e extrínsecos, fatores químicos e físicos, o processamento e condições de armazenamento do produto (ICMSF, 2002). Esta seleção não é fácil e tem gerado muita discussão e debate. Talvez esteja relacionada com as tentativas que têm sido feitas ao longo dos anos para aplicar vários termos, de modo a distinguir as diferentes funções dos indicadores, por exemplo,

microrganismo índice, microrganismo marcador, microrganismo modelo e microrganismo sentinela (Tortorello, 2003). Odonkor e Ampofo (2013) sugerem a divisão dos microrganismos indicadores em três grupos (Tabela 3): (i) indicadores microbianos gerais (processo); (ii) indicadores fecais, como *E. coli*; (iii) microrganismos índice e microrganismos modelo. Porém, a existência de duas categorias gerais de indicadores tem mostrado um maior consenso: (i) indicador de qualidade (qualidade higio-sanitária e qualidade fecal); (ii) indicador de segurança. Os indicadores de segurança sugerem um possível risco microbiano e a sua utilização destina-se a minimizar o risco de exposição ao perigo. Os indicadores de qualidade são usados para avaliar questões importantes para a aceitação do produto, por exemplo, vida útil de prateleira, características organolépticas e deterioração (*et al.*, 2001; Oliveira, 2011).

Tabela 3 - Definição de indicador e microrganismos índice e modelo (Odonkor e Ampofo, 2013).

| Grupo | Definição |
|---------------------------------------|--|
| Indicador de processo | Um grupo de microrganismos que demonstra a eficácia de um processo. |
| Indicador fecal | Um grupo de microrganismos que indica a presença de contaminação fecal. Exemplo, são os coliformes termotolerantes e <i>E. coli</i> . Estes microrganismos apenas indicam a possibilidade de os microrganismos patogénicos estarem presentes. |
| Microrganismos índice e modelo | Um grupo/ou espécies indicam a presença e o comportamento do patogénico, tais como <i>E. coli</i> como índice para <i>Salmonella</i> . O grupo/microrganismo pode ser utilizado para prever a degradação alimentar em estudos de vida útil de prateleira |

Segundo Jay (1998) quando os microrganismos indicadores são utilizados com vista à qualidade microbiológica do produto devem satisfazer os seguintes critérios: (i) devem estar presentes e detetáveis em todos os alimentos, cuja qualidade (ou falta dela) está a ser avaliada; (ii) devem ser facilmente detetados e enumerados e claramente distinguíveis de outros microrganismos; (iii) devem ser enumeráveis num curto período de tempo, de preferência dentro de um dia de trabalho; (iv) e o seu crescimento não deve ser prejudicado por outros componentes da flora dos alimentos. *E. coli* vai ao encontro destes critérios, sendo inclusive o melhor indicador de contaminação fecal dentro dos coliformes fecais, pela ICMSF (2000).

De acordo com Jay *et al.* (2005). Shardingger sugeriu a utilização de *E. coli* como um indicador de contaminação fecal em 1892. Este facto foi baseado na premissa da *E. coli* estar abundantemente disseminada em fezes e não ser encontrada normalmente em outros habitats. Além disso, *E. coli* pode ser facilmente detetada pela sua capacidade de fermentar glicose e facilidade de isolamento e identificação comparativamente a outros agentes patogénicos gastrointestinais. Três anos mais tarde, foi sugerido por Smith a utilização desta bactéria como identificador de potabilidade da água, iniciando o uso do parâmetro coliformes como indicadores de patogénicos na água. Uma prática que foi alargada ao leite pasteurizado, produtos lácteos e posteriormente, a outros alimentos (Kornacki e Johnson, 2001). Assim, a presença de *E. coli* em alimentos ou em água

tornou-se aceite como indicador de contaminação fecal. Mas desde então, tentativas têm sido feitas para definir a significado higiénico deste microrganismo. A sua presença nos alimentos pode ser vista como indicador de falhas no processamento, manuseamento e o armazenamento inadequado (Jay *et al.*, 2005).

Apesar do conceito não ser consensual, *E. coli* tem sido usada como indicador de qualidade higio-sanitária e indicador fecal (Wehr e Frank, 2004; Oliveira, 2011) e a sua análise é recomendada por regulamento europeu conforme Regulamento (CE) nº 1441/2007.

Segundo o Regulamento (CE) nº 1441/2007, *E. coli* juntamente com os microrganismos aeróbios, Enterobacteriaceae, *Salmonella* e estafilococos coagulase positivo são classificados como microrganismos indicadores de higiene na produção. Estes microrganismos estão definidos como critérios microbiológicos de higiene de processos. Os critérios indicam se o processo de produção funciona de modo aceitável, estabelecendo um valor de contaminação indicativo acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar. A análise de *E. coli* é obrigatória nos produtos apresentados na Tabela 4. Os critérios de higiene não são aplicáveis aos produtos colocados no mercado. Para estes produtos são aplicados os critérios de segurança (define a aceitabilidade de um produto ou de um lote de géneros alimentícios): *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, enterotoxinas estafilocócicas, *Enterobacter sakazakii*, histamina e *E. coli* (utilizada como indicador de contaminação fecal em moluscos bivalves vivos e equinodermes, tunicados e gastrópodes vivos) (Regulamento (CE) nº 2073, 2005; Regulamento (CE) nº 1441, 2007).

A presença de *E. coli* em alimentos não constitui uma prova direta da presença de patogénicos intestinais, como por exemplo *Salmonella*, mas implica um certo risco da presença destes patogénicos. Em muitos produtos alimentares a sobrevivência de *E. coli* é semelhante à da *Salmonella*. No entanto, vários patogénicos podem sobreviver após *E. coli* ter sido destruída. Assim, a presença de *E. coli* nos alimentos não implica uma estreita correlação com a presença de *Salmonella* ou de outros microrganismos patogénicos (Oliveira, 2011). *E. coli* só serve como microrganismo indicador relevante apenas se a sua taxa de sobrevivência em um determinado ambiente é igual ou ligeiramente maior do que a da bactéria patogénica (Winfield e Groisman, 2003).

Tabela 4 - Categoria de produtos com obrigatoriedade da análise de *E. coli*, como indicador de falta de higiene nos processos (Regulamento (CE) n° 2073, 2005; Regulamento (CE) n° 1441, 2007).

| Categoria de produtos | |
|---|--|
| Carne e produtos derivados | Carne picada, carne separada mecanicamente, preparados de carne. |
| Leite e produtos lácteos | Queijo fabricado com leite ou soro de leite (que tenha sido submetido a tratamento térmico), manteiga e natas fabricadas com leite cru ou leite (que tenha sido submetido a tratamento térmico mais baixo que o da pasteurização). |
| Produtos da pesca | Produtos à base de crustáceos e moluscos cozidos (descascados e sem concha). |
| Produtos hortícolas, frutas e produtos derivados | Frutas e produtos hortícolas pré-cortados (prontos a consumo) e sumos de frutas e de produtos hortícolas não pasteurizados (prontos para consumo). |

1.3. Metodologias clássicas de enumeração de *E. coli* em alimentos

Os métodos de análise microbiológica incluem métodos para enumeração (métodos quantitativos) e métodos para pesquisa ou deteção (métodos qualitativos) (Jasson *et al.*, 2010).

Os métodos qualitativos são métodos de análise, que detetam a presença ou ausência da substância ou microrganismo a analisar, quer direta ou indiretamente, numa determinada quantidade da amostra (ISO 16140, 2003). Estes métodos são utilizados para a deteção de patogénicos, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* e *E. coli* 0157 (Jasson *et al.*, 2007; Wu, 2008).

Os métodos de análise que permitem quantificar uma substância ou microrganismo, quer direta ou indiretamente, numa determinada quantidade de amostra são métodos quantitativos (ISO 16140, 2003). A contagem de microrganismos viáveis em caixa (ou placa) de Petri através de sementeira à superfície ou por incorporação em meios de cultura sólidos, bem como a contagem de microrganismos viáveis em meios líquidos através da técnica designada por “número mais provável” (NMP), constituem exemplos de métodos microbiológicos clássicos quantitativos (Blodgett, 2005; Jasson *et al.*, 2010).

Um dos métodos clássicos (ou convencionais ou tradicionais) mais utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos é a contagem em placas através de sementeira ou incorporação (Tortora *et al.*, 2001). A contagem em placas é um dos métodos mais antigos desenvolvidos para a enumeração de microrganismos em rotina. A técnica foi introduzida por Robert Koch (1880) com o desenvolvimento de meios de cultura de ágar e em 1895 foi reconhecido o seu procedimento. Em 1916, Breed e Dotherer formalizaram o procedimento deste método (Easter, 2005).

Na contagem em placas, os alimentos são previamente homogeneizados em diluente estéril, de forma a suspender os microrganismos presentes na amostra, preparando-se

assim a suspensão-mãe (Harrigan, 1998). Os diluentes a usar podem ser variados, sendo escolhido o adequado em função do tipo de alimento e propósito da análise (ISO 6887-1, 1999). Um inóculo da suspensão-mãe, ou de uma diluição conhecida da suspensão-mãe, é misturado com o meio de cultura de ágar fundido em placa (no caso da sementeira por incorporação) ou o inóculo é espalhado e adsorvido à superfície de meio de cultura solidificado (no caso da sementeira à superfície) (Harrigan, 1998). As placas são incubadas nas condições apropriadas para o microrganismo em análise e as colónias são contadas manualmente para determinar o número de unidades formadoras de colónias (UFC). Podem ser realizadas diluições da suspensão-mãe, sendo utilizadas para contagem as placas que apresentem entre 15 (ou 30) e 300 UFC. A contagem das placas com alto número de UFC é propensa a erros, pois requer um elevado nível de atenção por parte do técnico. Portanto, muitas vezes, a placa é dividida em partes e apenas uma parte é contada. Esta é utilizada para estimar a contagem de toda a placa por extrapolação (Blodgett, 2008). Além disso, o elevado número de UFC numa placa pode levar a falsos resultados, devido à superlotação das bactérias na placa. Este método depende da precisão de determinação de UFC (Brugger *et al.*, 2012).

A contagem de tubos múltiplos, também designado por NMP, foi introduzida por McCrady há 98 anos (McCrady, 1915). O NMP é estimado a partir da presença/ausência do microrganismo alvo em cada tubo, sendo os tubos inoculados com a amostra diluída consecutivamente. As diluições da amostra são concretizadas estudando-se 1 g, 0,1 g e 0,01 g de amostra. Cada uma destas 3 diluições é inoculada em 3 ou 5 tubos de meio de cultura (Harrigan, 1998). Após a incubação, o número de tubos positivos para cada diluição é contado. O número de microrganismos na amostra original é determinado através de tabelas padrão de NMP com base no número de tubos positivos para cada diluição considerando-se, assim, o factor de diluição. O método é de natureza estatística e os resultados de NMP são geralmente mais elevados do que os resultados de contagem em placa, provavelmente devido à melhor recuperação dos microrganismos (Jay *et al.*, 2005).

Algum tempo atrás, as metodologias clássicas de enumeração de *E. coli* implicavam o uso de um meio de cultura seletivo para coliformes, sendo posteriormente necessário proceder a testes de confirmação. Os métodos para testes de coliformes geralmente incorporam as características fisiológicas distintivas do grupo, ou seja, utilizam meios de cultura que proporcionam a fermentação da lactose e a resistência a sais biliares (Tortorello, 2003). Tal se verifica tanto no método de contagem de placas como no método do NMP.

A contagem de *E. coli* era realizada em três fases, independentemente do método usado (contagem em placa ou NMP): (i) teste presuntivo; (ii) teste confirmatório para coliformes; (iii) teste confirmatório para *E. coli* (Hayes, 1995).

Pelo método de contagem em placas, a primeira fase envolvia a enumeração de coliformes, fecais e não fecais, através da utilização de meios seletivos, como o MacConkey ágar e o *Violet Red Bile* (VRB). Estes meios continham: (i) uma fonte de nutrientes (peptona); (ii) a lactose, a qual é utilizada pelos coliformes para a produção de ácido (e gás); (iii) um indicador de pH (vermelho neutro). O último meio de cultura

continha um agente seletivo adicional, o violeta de cristal. As placas de Petri inoculadas com a amostra eram incubadas por 24 horas a 37° C. Após, a incubação as colônias características de coliformes surgiam de cor vermelha. Em alternativa aos meios sólidos desta primeira fase, usavam-se os meios líquidos similares, tal como o caldo *Lauril Sulphate Tryptose* (LST). Neste caldo eram introduzidos tubos de fermentação (Durham) para a recolha do gás produzido pela degradação da lactose pelos coliformes. Quando os meios líquidos eram utilizados na enumeração de coliformes e de outros microrganismos a técnica NMP era usada. O NMP presuntivo baseava-se no número de tubos que exibiam a produção de ácido (e gás) nos tubos Durham após 24 – 48 horas de incubação. O resultado era calculado utilizando quadros do NMP (Hayes, 1995). Nesta fase recuperavam-se os coliformes em *stress* e obtinham-se resultados presumíveis.

Na segunda fase, confirmação da presença de coliformes, efetuavam-se repicagens a todos os tubos que exibissem a produção de ácido e gás (método NMP) ou o aparecimento de colônias suspeitas de coliformes em placas de ágar (método da contagem em placas) em tubos de caldo *Brilliant Green Bile* (BGB). Os tubos já inoculados permaneciam na estufa a 37° C durante 24 horas. O BGB é um meio mais seletivo que os anteriores, detetando a presença de coliformes através da produção de gás (Hayes, 1995).

A fase final servia para confirmação da presença de *E. coli*. Esta fase podia ser feita com a colocação dos tubos de BGB a 44° C durante um período de 24 horas, em vez de coloca-los a 37° C durante 24 horas, como era efetuado na segunda fase, saltando assim, a etapa confirmatório da presença de coliformes (2° etapa). Ao mesmo tempo tubos de peptona eram inoculados dos tubos LST, presumíveis de conter coliformes (provindos da primeira fase, teste presuntivo), iam também a incubar a 44° C durante 24 horas e subsequentemente, testados quanto à presença de indol (para este fim utilizava-se o reagente de Kovacs constituído por álcool isoamílico, p-dimetilaminobenzaldeído e ácido clorídrico concentrado (Boadi *et al.*, 2010). Em alternativa ao caldo BGB do NMP, o meio sólido eosina azul de metileno ágar era usado para a contagem em placa. Neste método tanto podiam ser confirmados coliformes presuntivos ou coliformes confirmados, primeira e segunda fases. As placas de Petri eram incubadas a 37° C durante 24 horas. *E. coli* era distinguida pelo brilho metálico das colônias azuis-negras (Hayes, 1995).

A técnica do método de contagem em placa apesar de simples era morosa (Fung, 2002). O crescimento e distribuição das colônias na superfície da placa de Petri nem sempre eram homogêneos: as colônias podem ter diferentes diâmetros, densidades e formas e/ou podem crescer até as colônias se juntarem. Deste modo, o método tornava-se menos preciso (Corkidi *et al.*, 1998). Este método requeria uma razoável experiência do operador, nomeadamente quando era necessário confirmar resultados, mão-de-obra intensiva, a recuperação das células em *stress* era mais difícil e eram pouco rápidos devido aos prolongados períodos de incubação (García-Armesto *et al.*, 1993). Mas, também devido à demorada preparação da amostra, diluições em série e contagem de UFC. Além disso, grandes volumes de análises podiam levar a custos significativos no consumo de grandes quantidades de materiais, incluindo materiais descartáveis, como placas de Petri (Sieuwerts *et al.*, 2008). Estas dificuldades limitavam o número de

amostras que podiam ser examinadas e tornavam mais difícil a rotina dos laboratórios (Fung, 2002).

Por outro lado, a técnica do NMP possibilitava uma estimativa do número de microrganismos viáveis presentes numa determinada amostra sólida ou líquida. Utilizam-se meios líquidos para crescimento do(s) microrganismo(s) alvo. Quando se pretendia enumerar um microrganismo específico era necessário utilizar meio líquido seletivo, ou seja específico para o crescimento das bactérias pretendidas (Harrigan, 1998). Os meios líquidos facilitavam a recuperação de células em *stress* (isto é, células de microrganismos que se encontravam viáveis mas não se desenvolviam em meios sólidos). Incluíam-se neste caso microrganismos que foram sujeitos a processamentos alimentares (tratamentos térmicos agressivos, salinidades elevadas, modificação da atmosfera envolvente, entre outros). Por outro lado, era particularmente útil na análise de amostras que contêm partículas que interferem com os métodos de enumeração em placas, mas também útil para amostras que apresentavam um reduzido número de microrganismos (Blodgett, 2005; Sutton, 2010). No entanto, a análise decorria ao longo de 3 dias, sendo necessário proceder a repicagem para novo meio ao fim de 48 horas (Hayes, 1995). Esta metodologia necessitava de um grande número de tubos por análise, sendo a preparação dos meios de cultura bastante morosa (Mara e Horan, 2003).

Ao longo dos anos, os métodos clássicos foram sofrendo alterações até chegarem aos métodos de análise de hoje. Dentro destes métodos de análise existem métodos padronizados e estes incluem os métodos publicados pela *International Organization for Standardization* (ISO), que constituem a referência das metodologias usadas pelos laboratórios de análises alimentares nacionais. A maioria destes métodos de referência ainda são baseados em metodologias clássicas e, como tal, descrevem sementeiras (por incorporação ou à superfície) em meios sólidos e/ou líquidos a fim de proporcionar o crescimento, isolar, enumerar ou caracterizar o organismo alvo. Foram desenvolvidos com base na experiência e decididos por consenso internacional. Portanto, são métodos reconhecidos internacionalmente e com uma ampla aceitação (Jasson *et al.*, 2010).

Os métodos padronizados (métodos de referência) para a enumeração de *E. coli* em alimentos são três: (i) técnica de contagem de colónias a 44° C, usando membranas e 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucurónico (BCIG) (ISO 16649-1, 2001); (ii) técnica de contagem de colónias a 44° C, usando o 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucurónico (BCIG) (ISO 16649-2, 2001); (iii) técnica do NMP (ISO 16649-3, 2001).

1.4. Deteção enzimática como método alternativo na enumeração de *E. coli* em alimentos

Com o objetivo de reduzir o tempo de preparação e o tempo da análise propriamente dita, bem como aumentar a exatidão e a especificidade da análise, novas técnicas (ditas rápidas ou melhor alternativas) têm vindo a ser desenvolvidas para a deteção, diferenciação e enumeração de microrganismos, como *E. coli*. Estas baseiam-se na utilização de substratos enzimáticos ligados a compostos cromogénicos e fluorogénicos

para detecção de atividades enzimáticas específicas (Manafi *et al.*, 1991). Dyer (1970) foi o primeiro a sugerir a utilização destes compostos na detecção de enzimas bacterianas. Enquanto, Dahlen e Linde (1973), mostraram ser possível a detecção enzimática numa placa com ágar. Bascomb (1987), descreveu os substratos enzimáticos cromogénicos e fluorogénicos, bem como as suas aplicações e apenas recentemente se aplicou estes conhecimentos no desenvolvimento de metodologias alternativas.

Os meios de cultura cromogénicos e fluorogénicos são meios de crescimento microbiológicos que contêm substratos enzimáticos ligados a um composto cromogéneo (ou seja, origina uma mudança de cor), fluorogéneo (conduz à emissão de fluorescência) ou a junção de ambos. A população microbiana alvo possui sistemas de enzimas cujas reações conduzem ao metabolismo do substrato enzimático (açúcar ou aminoácido) que liberta o cromogéneo/fluorogéneo originando mudança de cor e/ou fluorescência sob luz ultravioleta (UV). Para além das vantagens acima referidas, a incorporação de tais substratos enzimáticos num meio seletivo pode evitar a etapa de confirmação e, como tal, eliminar a necessidade de outros testes bioquímicos para caracterizar as estirpes (Manafi, 2000; Perry e Freydiere, 2007).

Os compostos fluorogénicos e/ou cromogénicos podem ser divididos em 4 grupos: (i) os corantes fluorogénicos, tais como o ácido 8-anilino-1-naftalenossulfico (ANS) e laranja de acridina (*Acridine Orange* - AO), que permitem uma passagem da fluorescência do corante para o ADN ou para uma proteína de células bacterianas; (ii) os indicadores de pH fluorescentes, que permitem a mudança na intensidade de fluorescência ou absorvância de um indicador de pH, por exemplo a acridina ou 7-hidroxicumarina; (iii) os corantes tais como o azul de metileno, verde Janus B e índigo carmim, ao tornarem-se incolores produzem fluorescência; (iv) os substratos cromogénicos e fluorogénicos de enzimas (têm sido utilizados em bioquímica, principalmente com o propósito de estudar a cinética da enzima específica) originam o cromossulfúrico ou fluoróforos (Manafi, 1996).

Os substratos enzimáticos cromogénicos mais usados são derivados, principalmente de fenol e de índole (Manafi, 1996). Estes substratos e a cor libertada pode ser vista na Tabela 5. Por outro lado, os substratos enzimáticos fluorogénicos mais vulgarmente utilizados são os derivados de cumarina: 4-metil-umbeliferona (4-MU) e 7-amino-4-metilcumarina (7-AMC) (Manafi *et al.*, 1991). Maddocks e Greenan (1975) descreveram um ensaio, em que os derivados de 4-MU foram utilizados e Fujiwara e Tsuru (1978) foram os primeiros a usar os derivados de 7-AMC para quantificação de peptidases bacterianas.

Tabela 5 - Substratos cromogénicos usados com mais frequência (Manafi *et al.*, 1996). ONP - *o*-nitrofenóis; PNP - *p*-nitrofenóis.

| Derivados | Substrato cromogénico | Cor produzida |
|-----------|-----------------------------|---------------|
| Fenol | ONP | Amarela |
| Fenol | PNP | Amarela |
| Índole | 5-bromo-6-cloro-3-indol | Magenta |
| Índole | 6-cloro-3-indol | Salmão |
| Índole | N-metilindol | Verde |
| Índole | 5-iodo-3-indol | Iodo |
| Índole | 5-bromo-4-cloro-3-indol-(X) | Azul |

Os meios de cultura cromogénicos e fluorogénicos para a enumeração de *E. coli* utilizam a enzima β -D-glucuronidase (GUD) como indicador da sua presença.

A GUD é uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos β -D-glucopiranosidurónico nos seus derivados agliconas e ácido D-glucuronídeo (Wadouachi e Kovensky, 2011). A atividade da GUD pode ser medida por meio de diferentes substratos cromogénicos e fluorogénicos, Tabela 6 (Abboo e Pletschke, 2010).

Tabela 6 - Alguns substratos cromogénicos e fluorogénicos que podem ser empregues para a deteção de *E. coli* (Rompré *et al.*, 2002). MUG - 4-metilumbeliferil β -D-glicuronídeo; FDGlcU - Fluorescein-di- β -D-glicuronídeo; BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glicuronídeo; 8HQG - 8-hidroxiquinolina- β -D-glicuronídeo.

| Substratos | Cor produzida |
|---|-----------------------|
| MUG | Azul fluorescente |
| Resorufin-β-D-glicuronídeo | Vermelho fluorescente |
| FDGlcU | Verde fluorescente |
| BCIG | Azul |
| 8HQG | Preto |
| Fenoltaleína-β-D-glicuronídeo | Vermelho |

Um dos substratos cromogénicos mais usado é o BCIG. Este tem sido utilizado para detetar ou enumerar *E. coli* em água, urina e alimentos (Brenner *et al.*, 1993). Watkins *et al.* (1988) descreveu pela primeira vez a enumeração de *E. coli* em efluentes secundários de águas residuais e de marisco a partir deste composto. Os resultados do estudo demonstraram uma elevada correlação entre as reações BCIG positivas e a identificação de colónias de *E. coli*, tornando o BCIG extremamente útil para a rápida deteção fenotípica das UFCs desta espécie (Watkins *et al.* 1988). Em 2001, o BCIG foi adotado pela ISO para a enumeração de *E. coli* em todas as categorias de alimentos, sendo parte integrante do meio de cultura *Tryptone-Bile X-Glucuronídeo Ágar* (TBX) (ISO 16649-2, 2001). BCIG ao ser degradado pela GUD produz o ácido glucuronídeo (incolor) e o bromo-cloro-índole (precipitado azul-esverdeado). É este último composto que confere a coloração às colónias características de *E. coli* (Manafi, 1991).

Para além do TBX, outros meios de cultura cromogénicos são usados na enumeração de *E. coli* e estão em conformidade com a ISO 16649-2 (2001) (Jasson *et al.*, 2010). Exemplos destes meios de cultura encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Exemplos de meios de cultura para a enumeração de *E. coli* em alimentos, para além do TBX (Jasson *et al.*, 2010). REBECA[®] - Rapid Enterobacteria *Escherichia Coli* Coliform Ágar.

| Meio de cultura | Fabricante |
|---|------------------------|
| CHROMagar[®] <i>E.coli</i> | CHROMagar [™] |
| REBECA[®] | AES CHEMUNEX |
| ChromID[®] Coli | bioMèrieux |
| Cromocult[®] Coliform Agar | Merck |
| Brilliance <i>E.coli</i>/Coliform Selective Agar | Oxoid |
| RAPID[®] <i>E. coli</i> 2 Agar | Bio-Rad |

O composto fluorogénico 4-MU tem sido amplamente explorado para o diagnóstico em microbiologia, devido à sua baixa toxicidade, facilidade de hidrólise e a intensa fluorescência gerada (Perry *et al.*, 2006). Este composto é solúvel em água, altamente sensível e específico. Contudo, a sua utilização é limitada devido à dependência do pH e

à necessidade de luz UV para a leitura dos resultados (Manafi *et al.*, 1991). Em particular, os derivados de glicósido de 4-MU são amplamente utilizados para a detecção de enzimas bacterianas, tais como a GUD (Perry *et al.*, 2006). A 4-MU é resultante da degradação do substrato 4-metil-umbeliferil β -D-glucuronídeo (MUG) pela enzima GUD. O aparecimento da fluorescência azul quando as placas ou tubos são irradiados com luz UV de comprimento de onda de 365 nm são gerados pela 4-MU (Feng *et al.*, 2002).

Devido à sua versatilidade e estabilidade o MUG pode ser incorporado em meios líquidos e meios sólidos sem perder a sua funcionalidade. A Tabela 8 apresenta exemplos destes meios de cultura. A adição de MUG aos meios líquidos tem como finalidade a distinção e detecção de *E. coli* de 18 a 20 horas (Manafi, 2000).

Tabela 8 – Exemplos de meios de cultura onde o MUG pode ser incorporado (Manafi, 2000). LST – Lauril Sulphate Tryptose; BGB – Brilliant Green Bile; VRB – Violet Red Bile.

| Meios de cultura líquidos | Meios de cultura sólidos |
|---------------------------|--------------------------|
| LST | VRB |
| Caldo EC | MacConkey |
| BGB | m-FC ágar |

Recentemente, o aparecimento de métodos rápidos/alternativos que também utilizam MUG como indicador para *E. coli* tem crescido. O sistema Colilert® da IDEXX (Maine, EUA) é um exemplo (Rice *et al.*, 1990), seção 1.6.

1.5. Inovações na detecção enzimática aplicada à enumeração de *E. coli* em alimentos

A inovação na enumeração de *E. coli* em alimentos tem incidido em duas áreas distintas. Por um lado no desenvolvimento de novas tecnologias (Fung, 2002). Neste caso incluem-se métodos baseados em análise elétrica (impedância, capacitância e condutância), bem como em princípios de biologia molecular, tais como a imunologia e a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Noble e Weisberg, 2005; Darsanaki *et al.*, 2013). Embora estas tecnologias sejam significativamente mais rápidas, específicas, simples de operar comparativamente à metodologia clássica, implicam grandes investimentos iniciais na aquisição de equipamentos e posteriormente, ao longo do trabalho de rotina, de reagentes caros (Darsanaki *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2013). Por outro lado, a inovação tem incidido também na modificação das metodologias clássicas de enumeração, desenvolvendo-se produtos comerciais pré-preparados cujo princípio embora baseado nas metodologias clássicas apresenta vantagens relativamente a essas. Estes métodos são baseados na contagem de UFC ou no NMP e não encurtam necessariamente o tempo de detecção. No entanto, reduzem a carga de trabalho e facilitam o fluxo do mesmo, através da redução das manipulações e/ou necessidade de uma completa infraestrutura, bem como facilitam a automatização e reduzem o erro associado ao operador (Fung, 2002). Exemplos de métodos baseados na contagem de UFC e as inovações no método NMP encontram-se na Tabela 9 e Tabela 10, respetivamente.

Tabela 9 – Produtos comerciais baseados na contagem de UFC (Jasson *et al.*, 2010). UFC – Unidade formadora de colônias.

Métodos de contagem de UFC

3M Petrifilm™ (3M)

(3M Health Care, 2013a)

Rida® Count (r-biopharm)

(Labolytic, 2013)

Compact Dry® (Nissui Pharmaceutical)

(Nissui Pharmaceutical, 2013)

Tabela 10 – Produtos comerciais baseados no método do NMP (Jasson *et al.*, 2010). NMP – Número mais provável.

Métodos do NMP

SimPlate® (BioControl systems)

(BioScience Diagnostics, 2012)

TEMPO® (bioMérieux)

(Oliveira, 2011)

Colilert®-18

(IDEXX, 2013a)

As placas Petrifilm™ são placas de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de microrganismo. (3M Health Care, 2013b). No caso da *E. coli* as placas

possuem a denominação *Petrifilm™ E. coli and Coliforms Count Plates* (EC). Estas placas também permitem enumerar coliformes (3M Health Care, 2013b). Cada placa é composta por um filme de papel com quadrículas impressas recobertas de polipropileno (filme base) que contem: (i) nutrientes; (ii) agente gelificante; (iii) indicador de atividade enzimático. A placa termina na parte superior com outro filme de polipropileno (filme superior) composto novamente pelo gel e o indicador para facilitar a enumeração de *E. coli* (Ximena e Alexandra, 2008). A Tabela 11 descreve estes constituintes.

Tabela 11 – Constituintes do meio de cultura *Petrifilm™ EC* (3M Health Care, 2001; 3M Health Care, 2008).
VRB – Violet Red Bile; BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronídeo.

| Constituintes do meio de cultura <i>Petrifilm™ EC</i> | |
|--|------------------------------------|
| Nutrientes | VRB, lactose e peptona de gelatina |
| Agente gelificante solúvel em água fria | Goma de guar |
| Indicador de atividade enzimática | BCIG |
| Indicador facilitador da enumeração de colónias | Tetrazólico |

A amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base e o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de um difusor plástico, a amostra é espalhada numa área delimitada. Após solidificação da substância gelificante, a placa é incubada na temperatura e tempo de acordo com o método validado usado pelo laboratório. Os métodos mais comuns estão na Tabela 12. Após a incubação, as colónias visíveis de *E. coli* (colónias azuis com gás) são enumeradas e o resultado é expresso em UFC/mL ou g, Figura 1. As colónias adquirem a cor azul, devido à degradação do BCIG pela enzima GUD, tal acontece nos restantes métodos alternativos de contagem de colónias (Rida® Count e Compact Dry®). O gás é retido no filme superior como resultado da fermentação da lactose pela *E. coli*. As colónias vermelhas com gás confirmam a presença de coliformes, uma vez que os coliformes são produtores de ácido e gás a partir da lactose. As colónias de coliformes que crescem na placa *Petrifilm™ EC* ao produzirem ácido fazem com que o indicador de pH torne a cor do gel vermelho mais escuro (3M Health Care, 2001), Figura 1.

Tabela 12 – Condições de incubação dos métodos mais comuns usados para a enumeração de *E. coli* pelo *Petrifilm™ EC* (3M Health Care, 2001). AOAC - Association of Official Analytical Chemists; NMKL - Nordic Committee on Food Analysis.

| Método validado | Condições de incubação |
|--|-------------------------------|
| Método Oficial AOAC 991.14 | 48 ± 2 horas a 35° C ± 1° C |
| Método Oficial AOAC 998.0 (carnes, aves e pescados) | 24 ± 2 horas a 35°C ± 1°C |
| Método NMKL (147.1993) | 48 ± 2 horas a 37° C |

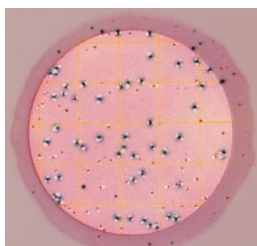


Figura 1- Colónias características de *E. coli* (azuis com gás) e coliformes (vermelhas com gás) numa placa de *Petrifilm™ EC* (3M Health Care, 2001).

As placas Rida® Count são placas de cultura prontas a usar, impregnadas de meio de cultura desidratado e filmes que podem ser aplicadas em diversos fins para controlos microbiológicos de rotina. Podem ser utilizadas tanto em amostras alimentares como em amostras ambientais (Ambifood e r-biopharm, 2010). Estas placas são muito semelhantes às Petrifilm™ (r-biopharm, 2010a). Para a enumeração de *E. coli* existe o Rida® Count *E. coli* (r-biopharm, 2010b) com os constituintes descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Constituintes dos meios de cultura Rida® Count *E. coli* (r-biopharm, 2004). VRB – Violet Red Bile; BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronídeo.

| Constituintes do meio de cultura | |
|--|---------------|
| Nutrientes | VRB |
| Indicador de atividade enzimática | BCIG |
| Inibidor de não coliformes | Sais biliares |

As colónias características de *E. coli* apresentam-se azuis (Figura 2) devido à enzima GUD que degrada o mesmo indicador do Petrifilm™ EC e Compact Dry®, o BCIG. Esta coloração surge ao fim de 24 a 48 horas a 35° C (Ximena e Alexandra, 2008).

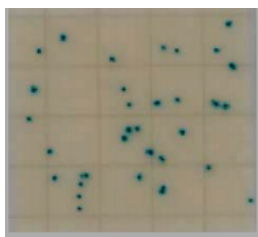


Figura 2 – Colónias características de *E. coli* (azuis) numa placa Rida® Count *E. coli* (r-biopharm, 2004).

A metodologia Compact Dry® é um procedimento de testes que permite determinar e quantificar microrganismos em indústrias de alimentos, laticínios, bebidas, cosméticos, entre outras (Hy Serve, 2010a). O Compact Dry® é formado por uma placa que contém um meio desidratado, que é posteriormente, reidratado com 1 mL de amostra diluída (Kodaka *et al.*, 2006). Este meio é composto por: (i) nutrientes com substâncias seletivas; (ii) substratos enzimáticos cromogénicos; (iii) agente gelificante solúvel em água fria (Kodaka *et al.*, 2006). A placa Compact Dry® *E. coli* (CD-EC) é específica para a enumeração de *E. coli*, mas também de coliformes (Hy Serve, 2010a). Esta é constituída pelos compostos apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Constituintes do meio de cultura CD-EC (Kodaka *et al.*, 2006). KNO₃ – Nitrato de potássio; NaCl – Cloreto de sódio; Magenta-GAL - 5-bromo-6-cloro-3-indol β-D-galactopiranosídeo; BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronídeo.

| Constituintes do meio de cultura CD-EC | |
|--|--|
| Nutrientes | Peptona, KNO ₃ , NaCl e piruvato de sódio |
| Agente gelificante solúvel em água fria | Polissacarídeos de algas |
| Indicador de atividade enzimática | Magenta-GAL e BCIG |

A CD-EC é um método que pode gerar resultados em 20 - 24 horas a 35° C. A placa usa o indicador de crescimento magenta-GAL (5-bromo-6-cloro-3-indol β-D-galactopiranosídeo) para detetar os coliformes e o indicador BCIG para detetar *E. coli*. O aparecimento da cor das colónias de *E. coli* (azul a azul-arroxado) deve-se a degradação do indicador pela GUD, Figura 3, tal como acontece nas duas metodologias

anteriores. As colónias vermelhas a rosas são características de coliformes, como resultado da degradação do magenta-GAL pela β -galactosidase (GAL), Figura 3 (Hosokawa e Kodaka, 2010).



Figura 3 – Colónias características de *E. coli* (azuis) e coliformes (rosas) numa placa de CD-EC (Hy Serve, 2010a).

Os produtos comerciais acima descritos apresentam as seguintes vantagens: (i) não necessita de preparação do meio de cultura, o qual reduz substancialmente o tempo de análise; (ii) é de fácil uso e tem múltiplas aplicações; (iii) proporciona resultados em curto tempo; (iv) ocupa menos espaço na incubadora, o qual permite processar um maior número de amostras eliminando problemas de armazenamento; (v) as placas inoculadas permanecem mais tempo sem ser afetadas por outros microrganismos; (vi) as placas não se desidratam tão facilmente como os meios preparados; (vii) ocorre maior recuperação de bactérias uma vez que não existe choque térmico (como na incorporação); (viii) as placas apresentam uma vida longa; (ix) as placas podem ser lidas em leitores de placas; (x) as placas vêm acompanhadas de um folheto para a interpretação das colónias; (xi) requer menos material de vidro; (xii) existe a redução do número de desperdícios; (xiii) a presença de substância indicadora permite a diferenciação visual. Porém, apresentam também desvantagens: (i) alguns produtos alimentares podem não ser facilmente dispersos nas placas; (ii) formação de bolhas entre o filme superior e inferior pode provocar uma desidratação e por consequente, a inibição do crescimento; (iii) a manipulação das placas não é simples; (iv) algumas amostras requerem diluições adicionais para que o indicador atue e permita a observação de colónias; (v) algumas amostras não são absorvidas totalmente; (vi) os fungos podem crescer nestas placas; (vii) o método não especifica o intervalo de contagem; (viii) o material inoculado dificulta a recuperação das colónias para futuras provas e confirmação (Ximena e Alexandra, 2008; Hy Serve, 2010b; Souza, 2013).

Quanto aos produtos comerciais mais utilizados na análise de *E. coli* e que se baseiam no NMP, existem o SimPlate[®], o TEMPO[®] e o Colilert[®]. Estes produtos comerciais necessitam de equipamentos/materiais adequados e de meios de cultura específicos.

Cada meio SimPlate[®] foi formulado para apresentar alta especificidade e sensibilidade na deteção de microrganismos e apresenta-se em dois formatos: doses individuais e doses múltiplas (BioControl, 2012a). O sistema SimPlate[®] foi desenvolvido pela Biocontrol para a determinação de microrganismos indicadores em alimentos, pela metodologia do NMP. É constituído por placas de plástico descartáveis prontas para uso em dois tamanhos, a normal 84 cavidades com uma contagem máxima de 738 microrganismos e a com 198 cavidades com contagem máxima de 1659 microrganismos (Townsend e Naqui, 1998). O meio de cultura é liofilizado, devendo ser reidratado com um diluente estéril, geralmente

água destilada esterilizada. Os inóculos das amostras são pipetados e colocados no centro das placas SimPlate[®] e em seguida, cobertas com o meio hidratado. O líquido é distribuído para as cavidades individuais, o excesso de líquido é retirado fazendo-se a drenagem para uma esponja lateral na placa e o resultado dá-se via conversão através de uma tabela de NMP específica para o sistema SimPlate[®] (Silva, 2002). O *Simplate[®] Coliform/E. coli* (CEc) utiliza a Tecnologia de Detecção Binária licenciada pela Biocontrol (BioControl, 2010; Townsend *et al.*, 1998). A CEc correlaciona a presença de enzimas GAL e GUD para a detecção de coliformes e *E. coli*, respetivamente. O meio CEc é especificamente formulado para favorecer o crescimento e detecção destes microrganismos em 24 horas de incubação a 35° C (AOAC International, 2006).

O composto ONPG (ortonitrofenil β -D-galactopiranosídeo) quando hidrolisado pela GAL produz o composto vermelho clorofenol que possui coloração laranja a roxa e o composto MUG quando hidrolisado pela GUD produz 4-MU que apresenta cor azul fluorescente quando exposto à luz UV a 365 nm. O número de cavidades coloridas (laranja a roxo) em cada placa é registado como coliformes. As cavidades fluorescentes azuis são registadas como positivas para *E. coli* (Townsend *et al.*, 1998). A Figura 4 exhibe as cores das cavidades características de *E. coli* e coliformes.



Figura 4 - Colónias características de *E. coli* (azuis) e coliformes (laranja a roxo) numa placa de CEc (Silva, 2002).

As vantagens apresentadas pelo fabricante incluem: (i) a facilidade para a preparação, ou seja, adição do meio liofilizado em água destilada esterilizada, dispensando a pesagem e a esterilização do meio; (ii) a facilidade de execução com a adição do meio e amostra na placa e incubação por 24 horas; (iii) as partículas de alimentos não necessitam de ser filtradas; (iv) a ampla faixa de contagem reduz a necessidade de diluições; (v) a facilidade para interpretar, as cavidades fluorescentes são facilmente visíveis à luz UV; (vi) contagem rápida e fácil; (v) cada placa permite contagens mais de duas vezes superior às placas de Petri tradicionais e os filmes, isso permite diminuir as diluições, economizar tempo, custo por análise e erros de leitura; (vii) o meio de cultura líquido permite a enumeração mais sensível (são necessários menos microrganismos para provocar a mudança de cor do indicador do que para formar uma colónia visível em placas de ágar) (viii) não necessita de duplicados (Beuchat *et al.*, 1998; Silva, 2002; BioControl, 2012b; BioControl, 2013). No entanto, a formação de bolhas nas placas e o aparecimento de reações falso-positivos em alguns alimentos podem ser algumas desvantagens deste método (Beuchat *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2000).

A bioMérieux desenvolveu o sistema TEMPO[®] que permite a contagem dos microrganismos baseada no método NMP associado à tecnologia das cartas. TEMPO[®] é composto por um equipamento de leitura e um frasco de meio de cultura e por uma carta, específicos para cada teste. No caso da *E. coli* designa-se TEMPO[®] EC. O meio de

cultura é semeado com a amostra a testar. O conjunto é transferido para os 48 poços com 3 volumes diferentes da carta, através do TEMPO® Filler (TEMPO-Estação de preparação). A carta é constituída por 3 séries de 16 poços (pequenos, médios e grandes). O microrganismo alvo multiplica-se durante a incubação no meio de cultura que resulta num sinal detetado pelo leitor de TEMPO® Reader-Estação de leitura. Ou seja, no decurso da incubação (22 - 27 horas a 37° C), através da atividade GUD as *E. coli* presentes na carta degradam o substrato do meio de cultura (MUG) e permitem o aparecimento de um sinal fluorescente detetado pelo leitor TEMPO®, Figura 5. Em função do número e do tipo dos poços positivos, o sistema TEMPO® deduz o número deste microrganismo presente inicialmente na amostra, segundo um cálculo baseado no método NMP (Oliveira, 2011).

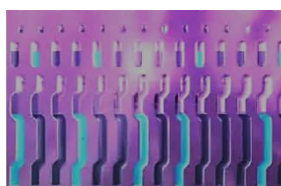


Figura 5 – Poços fluorescentes positivos de *E. coli* no método TEMPO® EC (bioMérieux, 2013).

Cattapan *et al.* (2007), Kunicka (2007) e Sohier *et al.* (2007) verificaram a redução do tempo da análise em estudos de fluxo de trabalho, que demonstraram uma redução de duas a três vezes no tempo de manipulação da amostra com a utilização do TEMPO®. Estes autores relatam a redução e a otimização do tempo de ensaio, que se deve ao tipo de sistema utilizado pelo equipamento TEMPO®, totalmente automatizado e baseado no metabolismo de substratos específicos produzidos pelos microrganismos. Permite, ainda, reduzir o volume reativo, o meio de cultura a ser empregado nos ensaios e a especificidade do ensaio (Cattani *et al.*, 2013). Todavia, a possibilidade de ocorrer (i) dosagem incorreta de água esterilizada para a reconstituição do meio de cultura; (ii) falha na correspondência da carta com o meio de cultura e com a amostra; (iii) erro na selagem da carta no TEMPO® Filler; (vi) e o método ser consideravelmente dispendioso, são desvantagens apresentadas por Oliveira (2011).

Os métodos de cultura alternativos para a enumeração de *E. coli* apresentados nesta seção encontram-se resumidos pela Tabela 15.

Tabela 15 – Métodos de cultura modificados para a enumeração de *E. coli*. Petrifilm™ EC - . Petrifilm™ *E. coli*; CD-EC - Compact® Dry *E. coli*; Simplate® CEc - Simplate® Coliform/*E. coli*; BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronídeo ; MUG - 4-metilumbefiril-β-D-glucuronídeo.

| Métodos de cultura modificados | Tempo/Temperatura de incubação | Indicador de atividade enzimática | Colónias características |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Petrifilm™ EC | 24-48 horas/35° C - 37° C | BCIG | Azul com gás |
| Rida Count Count <i>E. coli</i> | 24-48 horas/ 35° C | BCIG | Azul |
| CD-EC | 20-24 horas/35° C | BCIG | Azul |
| Simplate® CEc | 24 horas/35° C | MUG | Azul fluorescente |
| TEMPO® EC | 22-27 horas/37° C | MUG | Azul fluorescente |

1.6. Colilert®

O interesse no desenvolvimento de novos métodos rápidos e alternativos para a determinação de *E. coli* tornou-se cada vez mais urgente, devido às limitações (tempos de análise longos, falta de sensibilidade e precisão e incapacidade de detetar formas viáveis mas não cultiváveis) frequentemente associadas aos métodos convencionais. Entre as características fisiológicas vulgarmente utilizados para a identificação de *E. coli*, a enzima GUD tem sido amplamente relatada como um potencial marcador, existindo diversos produtos comerciais que permitem a deteção desta enzima e não requerem posterior confirmação dos resultados positivos (Caruso *et al.*, 2002). O método Colilert® é exemplo disso mesmo (Yoneyama e D'Alessio, 2013).

O Colilert®, desenvolvido pelos Laboratórios IDEXX, tem por base a DST (*Defined Substrate Technology*) (Grossi *et al.*, 2013). A DST surgiu na década de 1980 (patenteada por Edberg (1990) com o nº 4925789) e era usada na enumeração de espécies bacterianas a partir de amostras clínicas de urina. Esta tecnologia é baseada no princípio do fornecimento de alimento ao(s) microrganismo(s) alvo e não fornece sustento para outras bactérias. Por conseguinte, apenas este(s) microrganismo(s) pode(m) crescer sem ser necessário a adição de inibidores para eliminar outras bactérias. O substrato definido, substrato hidrossolúvel, é utilizado como fonte de nutrientes vitais para o microrganismo(s) que se deseja enumerar. A tecnologia pode ser ainda designada de autoanálise, porque existe uma mudança de cor produzida pelo microrganismo(s) alvo(s) sem existir a necessidade de testes de confirmação ou de trabalho técnico. Para realizar o teste acrescenta-se a amostra à fórmula em pó seguido de incubação. Requer um selador, uma lâmpada de 366 nm e uma incubadora. As mudanças de cor específicas indicam a presença do(s) microrganismo(s) alvo (Edberg *et al.* 1988; Edberg e Edberg, 1988).

O Colilert® é utilizado para a deteção e enumeração de coliformes e *E. coli* em amostras de água, por meio da hidrólise enzimática de substratos específicos, o ONPG e o MUG. O substrato ONPG é específico para a enzima constitutiva GAL presente nos coliformes. Enquanto, o substrato definido MUG é utilizado especificamente para a *E. coli*, por esta possuir a enzima GUD, como já foi referido na seção 1.4. (Buckalew *et al.*, 2006; Lopez-Roldan *et al.*, 2013).

O método Colilert® consiste em misturar o meio de cultura com ONPG e MUG com 100 mL de amostra, incubar e ler o resultado como presença/ausência (qualitativo) (Okoko *et al.*, 2012) ou NMP (quantitativo) (IDEXX, 2002). Assim, para enumerar coliformes e/ou *E. coli* utiliza-se a placa Quanti-Tray™ (*tray*). A amostra e o reagente Colilert® são introduzidos na *tray*, este é selado, incubado sendo contados os poços que exibem coloração amarela (no caso da contagem de coliformes) e fluorescência (no caso de *E. coli*). O NMP na amostra é determinado através de uma tabela de NMP fornecida pela IDEXX, ANEXO II (Pisciotta *et al.*, 2002; Koster *et al.*, 2003; IDEXX, 2013b). Este método permite enumerar diretamente coliformes e *E. coli* simultaneamente de 1 microrganismo/100 mL até 2×10^3 por 100 mL de amostra (IDEXX, 2011).

A amostra vai adquirir cor amarela quando os coliformes metabolizam o nutriente indicador ONPG. A cor amarela é devido à produção do ácido ONP resultante da

hidrólise do ONPG. A amostra vai emitir fluorescência sob luz UV (366 nm) quando *E. coli* presente metaboliza o indicador de nutriente MUG, libertando o composto 4-MU (IDEXX, 2011; Luster-Teasley e Ives, 2013). Os períodos de incubação vão depender se se está perante a formulação Colilert[®]-18 (18 horas de incubação) ou Colilert[®] (24 horas de incubação) (Eckner, 1998; Bonadonna *et al.*, 2007; IDEXX, 2013a; IDEXX, 2013c).

Diversos estudos têm testado o Colilert[®] em varias matrizes, nomeadamente em água doce (Covert *et al.*, 1989; Edberg *et al.*, 1991; Shadix e Rice, 1991; Covert *et al.*, 1992; Cowburn *et al.*, 1994; Fiksdal *et al.*, 1994; Fricker e Fricker, 1996; Eckner, 1998; Grasso *et al.*, 2000; Niemela *et al.*, 2003; Yakub *et al.*, 2002; Buckalew *et al.*, 2006), água potável (McFeters *et al.* 1992; Cowburn *et al.*, 1994; Fricker *et al.*, 1997; Edberg *et al.*, 1988; Niemela *et al.*, 2003), efluentes de águas residuais (Elmund *et al.*, 1999; Kramer e Liu, 2002; Eccles *et al.*, 2004), solos contaminados (Muirhead *et al.*, 2004), soluções salinas (Palmier *et al.*, 1993; Solo-Gabriele *et al.*, 2000; Pisciotta *et al.*, 2002; Kinzelman *et al.*, 2005) e em produtos alimentares (Jorquera, 2011).

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O parâmetro microbiológico *E. coli* constitui um indicador de qualidade higiénica e de segurança em alimentos e águas. A sua presença pode indicar contaminação fecal e a possível existência de outros agentes patogénicos, bem como abusos no processamento e boas práticas industriais. As metodologias clássicas de enumeração deste microrganismo em alimentos podem ser morosas, implicam mão-de-obra intensiva e empregam grandes volumes de consumíveis, principalmente quando se estudam um grande número de amostras. Em contrapartida, a IDEXX desenvolveu o meio de cultura Colilert® para a análise de *E. coli* em águas. Este método possibilita uma quantificação rápida, simples e económica, e a eventual superior recuperação de células de *E. coli* danificadas pelo ambiente. Pretende-se, neste trabalho, aplicar o Colilert® à enumeração de *E. coli* em alimentos, sendo objetivo geral deste estudo a avaliação da enumeração de *E. coli* em diferentes matrizes alimentares pelo método rápido Colilert®, através de comparação de resultados com o método de referência em alimentos.

2.2. Objetivos Específicos

Inicialmente pretende-se adaptar o método Colilert® à análise de alimentos com diferentes características e observar a versatilidade da metodologia. Posteriormente, estudar a exatidão da mesma, através da contaminação artificial das amostras alimentares, bem como a capacidade do Colilert® para recuperar *E. coli* naturalmente presente em alimentos congelados. Finalmente, e considerando a presente conjectura económica, pretende-se realizar uma análise de custos, confrontando com o método de referência.

Materiais e Métodos

3.1. Fases do trabalho prático

O estudo laboratorial decorreu ao longo de 3 fases, conforme esquematizado na Tabela 16.

Tabela 16 – As 3 fases do estudo laboratorial.

| Fases do estudo laboratorial | |
|-------------------------------------|--|
| Fase 1 | Observação da versatilidade do Colilert® na aplicabilidade a diferentes alimentos |
| Fase 2 | Apreciação da exatidão da metodologia usando amostras artificialmente contaminadas. |
| Fase 3 | Observação da recuperação de <i>E. coli</i> naturalmente presente em alimentos congelados. |

3.2. Local de estudo e preparação da amostra

As análises foram efetuadas no Departamento de Controlo Alimentar, Microbiologia Alimentar, no Laboratório de Medicina Veterinária, Lda (LMV) em Santarém. Este realiza análises microbiológicas e químicas em produtos para a alimentação humana e animal (LMV, 2008).

Os produtos alimentares foram rececionados pelo Laboratório nos meses de Dezembro de 2012 a Abril de 2013. Os alimentos estudados foram divididos em cinco categorias: (i) produtos de pastelaria com creme; (ii) carne crua; (iii) produtos da pesca crus; (iv) refeições pronto-a-comer; (v) iogurtes. Foram recolhidos, transportados e armazenados pelo LMV sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ \text{C}$) conforme prática de rotina do laboratório.

A suspensão-mãe das diferentes amostras foi preparada segundo a NP 1829 (1982). Adicionaram-se 25 g do alimento a 225 mL de água de peptona a 0,1% (Pinch Dilutor, bioMérieux, Marcy L'Étoile, França). Este diluente foi preparado com 1 g de *Peptone Water* (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Homogeneizou-se a suspensão-mãe em BagMixer® (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, França) até o produto alimentar ficar suspenso no diluente primário. Foram realizadas diluições em série sempre que necessário.

3.3. Métodos Microbiológicos de análise

A enumeração de *E. coli* em produtos alimentares foi efetuada com o método alternativo de deteção enzimática Colilert®-18, conforme Figura 1A (Anexo I), e o método de referência ISO 16649-2 (2001), conforme Figura 1B (Anexo I).

3.3.1. Método alternativo Colilert®-18

Após a preparação da suspensão-mãe ver seção 3.2., foram retirados 100 mL desta com uma pipeta estéril descartável, através do filtro existente no *BagFilter* (TEMPO® Bag, bioMérieux, Marcy L' Étoile, França), conforme Figura 6a, para um frasco Schott estéril com capacidade máxima de 100 mL (Figura 6b). Adicionou-se o meio desidratado Colilert-18® aos 100 mL de amostra (Figura 7a e Figura 7b) e agitou-se manualmente até o meio dissolver completamente. A mistura amostra/reagente permaneceu em repouso até que a espuma resultante da adição do reagente e da agitação desaparecesse (Figura 7c). Em amostras cuja espuma permaneceu mais tempo adicionou-se o reagente *Antifoam Solution* (IDEXX, Maine, EUA) para acelerar o desaparecimento desta (Figura 7d).



Figura 6 – a) Pipetagem de 100 mL de amostra através do filtro do *BagFilter*. b) Transferência de 100 mL de amostras para o frasco de Shott com volume máximo de 100 mL. (Fotografias do autor).



Figura 7 – a) Colilert®-18. b) Adição do meio de cultura Colilert-18® aos 100 mL de amostra. c) Mistura amostra/reagente em repouso. d) Reagente *Antifoam Solution* para o desaparecimento de espuma. (Fotografias do autor).

Com a mão segurou-se numa placa *tray* com poços múltiplos (Quanti-Tray®/2000, IDEXX, Maine, EUA) na posição vertical com a superfície dos poços voltado para a palma da mão, apertou-se a parte lateral superior da placa a fim de a abrir e melhor inserir a amostra previamente misturada com o meio de cultura. De seguida, verteu-se a mistura da amostra com o meio de cultura Colilert-18® (Figura 8a) e a placa foi selada a quente no Quanti-Tray® Sealer (Quanti-Tray® Sealer Model 2x, IDEXX, Maine, EUA). Para tal, inseriu-se a placa num molde de borracha (Quanti-Tray®/2000 97-well Rubber Insert, IDEXX, Maine, EUA), conforme Figura 8b, e encaixou-se no selador com o suporte de borracha virado para baixo e a folha de alumínio da placa virada para cima (Figura 9a). Após a selagem da placa, esta foi a incubar (Trade Raypa® Incuterm Digit, Barcelona, Espanha), a $35 \pm 0,5^\circ$ C durante 18 horas, Figura 9b e Figura 9c.

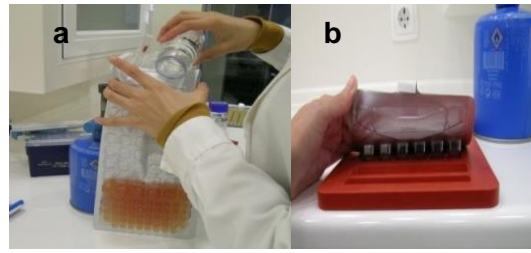


Figura 8 - a) Transferência da mistura amostra reagente para a tray. b) Colocação da tray cheia no suporte de borracha. (Fotografias do autor).

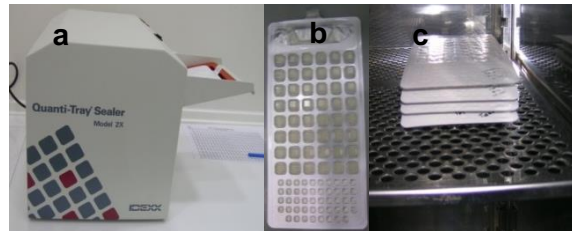


Figura 9 - a) Placa a selar a quente no Quanti-Tray® Sealer. b) Placas seladas e prontas a incubar. c) Placas na estufa de $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$. (Fotografias do autor).

Após a incubação, o número de poços grandes e pequenos presumíveis positivos para *E. coli* foram contados e o resultado foi calculado a partir da tabela do NMP (Anexo II). Entende-se como poços presumíveis positivos para *E. coli*, os poços de cor amarela que perante a luz UV (366 nm) adquiriram fluorescência azul (Figura 10a e Figura 10b).

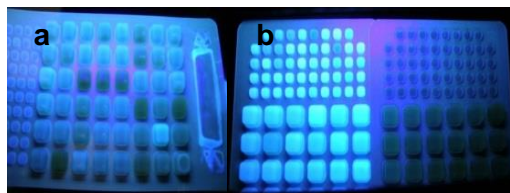


Figura 10 - a) Poços pequenos e poços grandes azuis fluorescentes de *E. coli* sob luz UV (366 nm). b) Diferença de poços positivos e poços negativos de *E. coli*. (Fotografias do autor).

3.3.1.1. Confirmação de resultados positivos e negativos

Atendendo a que, provavelmente foi a primeira vez que a *E. coli* foi enumerada através do Coliler[®]-18 nos alimentos estudados (bolo com creme, carne de porco picada, sopa “caldo-verde”, salada de vegetais crus e iogurte natural sólido) os poços positivos foram considerados resultados presumíveis positivos (e não resultados positivos) e nas fases 2 e 3 do presente estudo houve necessidade de confirmar a presença de *E. coli* nos poços que apresentaram fluorescência, ou seja os poços considerados resultados presumíveis positivos. Para tal, estes foram devidamente assinalados no verso da placa, face onde se procedeu à colheita. Efetuou-se um furo em cada poço assinalado e mergulhou-se a ansa nesse mesmo furo. O resultado deste processo pode ser visto na Figura 11. Procedeu-se a sementeira em placa de Petri com o meio TBX Ágar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), usando a técnica do riscado. As placas foram a incubadas a $44 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas, conforme ISO 16649-2 (2001). Após este período, os resultados foram lidos: as colónias verde-azuladas confirmaram a existência de *E. coli* nos produtos alimentares analisados.

A confirmação de resultados também foi feita em poços presumíveis de não conter *E. coli* (poços que não exibiram fluorescência), pelas mesmas razões anteriores. Se no meio TBX não existisse crescimento, os poços eram negativos.

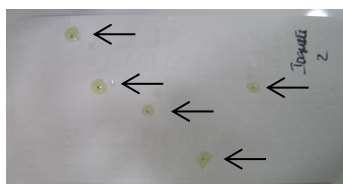


Figura 11 - Poços presumíveis de presença de *E. coli* assinalados com uma seta preta, após a perfuração dos mesmos com ansa. (Fotografia do autor).

3.3.2. Método de referência (ISO 16649-2, 2001)

De cada diluição da suspensão-mãe, transferiu-se 1 mL para duas placas de Petri esterilizadas. De seguida, verteu-se em cada placa de Petri cerca de 15 mL do meio TBX Ágar, previamente arrefecido a 44° C. O tempo que decorreu entre a distribuição do inóculo na placa de Petri e a incorporação do meio não foi superior a 15 minutos. Inverteram-se as placas inoculadas e colocaram-se em incubação a 44 ± 1° C (Memmert, Schwabach, Alemanha) por 24 horas.

Depois do período de incubação, procedeu-se à contagem das UFC características, ou seja das colónias de cor azul, em cada placa de Petri. Apenas foram consideradas as placas com um número inferior a 150 UFC típicas e inferior a 300 UFC no total (típicas e não típicas). O cálculo do número (N) de microrganismos por g foi obtido com a ajuda da equação apresentada na Figura 12, de acordo com a ISO 16649-2 (2001), sendo:

Σa – soma da contagem de UFC em todas as placas de duas diluições sucessivas nas quais uma, pelo menos, tem que conter no mínimo 15 UFC azuis;

V – volume de inóculo, em mL, inserido em cada placa;

n_1 – número de placas inoculadas na primeira diluição;

n_2 – número de placas inoculadas na segunda diluição;

d – fator de diluição correspondente à primeira diluição do inóculo [d = 1 no caso de produtos líquidos em que a amostra é diretamente inoculada].

$$N = \frac{\Sigma a}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Figura 12 - Fórmula de cálculo apresentada na ISO 16649-2 (2001) para a enumeração de *E. coli* GUD positiva (ISO 16649-2, 2001).

A fórmula de cálculo, apresentada em cima, foi usada no estudo preliminar, uma vez que se efetuou diluições.

3.4. Fase 1: Versatilidade do Colilert®

O método Colilert® foi desenvolvido para a análise de coliformes e *E. coli* em águas. No entanto, este estudo pretende aplicar o método a produtos alimentares. Assim, efetuou-se uma seleção prévia de alimentos a estudar, tendo em conta os produtos rececionados pelo LMV e alguns aspetos importantes do método Colilert® que comprovam a sua funcionalidade prática. A Tabela 17 expõe estes aspetos.

Tabela 17 - Aspetos considerados para avaliar a versatilidade e funcionalidade do método Colilert® em produtos alimentares.

| Aspetos considerados | |
|---|--|
| Posicionamento da amostra na placa | Amostra espalhada de forma homogénea em todos os poços. Ausência de partículas de alimento nos poços. |
| Cor dos poços na placa selada | Cor clara e suave dos poços antes e após a incubação. |
| Leitura de resultados à luz UV | Fluorescência perceptível/notória. Facilidade de distinção de poços positivos dos poços negativos. |

Os produtos estudados nesta fase foram divididos em cinco categorias: (i) produtos de pastelaria com creme; (ii) carne crua; (iii) produtos da pesca crus; (iv) refeições pronto-a-comer; (v) iogurtes. Os produtos de cada categoria sujeitos à seleção encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Categorias de produtos alimentares e os respetivos produtos sujeitos à seleção na fase 1.

| Categoria de Produtos Alimentares | Produtos Alimentares |
|--|---|
| Produtos de Pastelaria com creme | Bola de Berlim |
| Carne crua | Carne de porco picada |
| Produtos da Pesca | Dourada crua Salmão cru Camarão cozido |
| Pronto-a-comer (Take-away) | Sopa (caldo-verde) Arroz branco Bacalhau com natas; Salada de vegetais crus (alface e cenoura) |
| Iogurtes | Iogurte natural sólido |

3.5. Fase 2: Exatidão do método Colilert®

3.5.1. Estudo Preliminar

Os produtos selecionados foram contaminados artificialmente com *E. coli* (ATCC 25922) para se observar a exatidão da metodologia Colilert-18®. Para tal, foi realizado um estudo preliminar a fim de desenvolver um protocolo que permitisse inocular um número de células de *E. coli* conhecido, número esse passível de ser enumerado utilizando-se os dois métodos em simultâneo.

A estirpe de *E. coli* encontrava-se inicialmente armazenada a - 80° C (My Bio, Dairei, Dinamarca) num tubo de criocongelação preparado previamente pelo Laboratório para o seu controlo de qualidade. Retirou-se uma toma para um tubo com 10 mL de caldo *Maximum Recovery Diluent* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) que foi incubado a 37° C durante 16 horas, designando-se a cultura *overnight*, pois o crescimento decorreu durante a noite, das 18.00 horas às 10.00 horas do dia seguinte. Procedeu-se a diluições em série da cultura, usando peptona a 1%, tendo sido realizadas contagens através de incorporação em TBX. Este foi incubado e interpretado conforme a seção 3.3.2. Após crescimento, selecionou-se a diluição mais adequada á futura contaminação das suspensões-mãe.

3.5.2. Contaminação artificial

Com base nos resultados do estudo preliminar, foi desenvolvido o protocolo para a contaminação artificial. De acordo com esse protocolo transferiu-se 1 mL da diluição 10^{-4} da cultura *overnight* para a suspensão-mãe de cada produto alimentar (selecionado na seção 3.4.) para que o número final na referida suspensão fosse cerca de 10 microrganismos/mL (cerca de 10^3 microrganismos/100 mL).

Um dos produtos alimentares selecionados na seção 3.4. foi a carne de porco picada crua, produto cujo histórico do Laboratório aponta para elevada probabilidade de contaminação natural com *E. coli*. Por esse motivo, este produto alimentar foi esterilizado. Foram analisadas três amostras diferentes por produto alimentar. Os alimentos estudados, para além da carne de porco picada, foram: (i) bola de Berlim; (ii) dourada crua; (iii) sopa de caldo-verde; (iv) arroz branco; (v) salada de vegetais crus (alface e cenoura); (vi) iogurte sólido natural.

A Figura 1C (Anexo I) esquematiza o estudo realizado na fase 2. Após a contaminação artificial da suspensão-mãe, cada alimento foi analisado através do método Colilert-18[®] (seção 3.3.1.) e do método clássico (ISO 16649-2, 2001) (seção 3.3.2.). A suspensão-mãe foi diluída 10 vezes antes de ser introduzida na placa de forma a garantir um número inferior a 2419.6/100 mL e assim a possibilidade de leitura de um resultado concreto na tabela de NMP associada ao Colilert-18[®].

3.6. Fase 3: Recuperação de *E. coli* em alimentos congelados

A carne de porco picada crua é uma matriz alimentar com elevada probabilidade de estar naturalmente contaminada por *E. coli* (tendo em conta o histórico do Laboratório), constituindo o produto ideal para a última fase do trabalho ou fase 3. Esta fase encontra-se esquematizada na Figura 1D (Anexo I).

Inicialmente, uma porção de carne de porco crua foi convenientemente misturada, retirou-se uma parte da amostra para a preparação da suspensão-mãe (seção 3.2.) e enumerou-se *E. coli* através do método de referência (seção 3.3.2.). A restante parte da amostra foi congelada durante 16 horas -18° C. Após descongelação durante cerca

de 2 horas procedeu-se à análise em paralelo através do método Colilert®-18 (seção 3.3.1.) e do método clássico (seção 3.3.2.).

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos na fase 3 foram analisados através do teste de análise de variância com 1 factor (ANOVA-1) de acordo com Zar (2009). As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0.05$).

Resultados e Discussão

O Colilert® foi concebido pela IDEXX para a enumeração de coliformes e *E. coli* em águas. No entanto, neste estudo pretendeu-se aplicar este método à contagem de *E. coli* em alimentos. Para tal, dividiu-se o estudo prático em três fases: (i) observação da versatilidade do Colilert®; (ii) apreciação da exatidão do método Colilert®; (iii) observação da recuperação de *E. coli*.

4.1. Fase 1: Observação da versatilidade do Colilert® e seleção dos produtos alimentares

Nesta primeira fase do trabalho pretendeu-se selecionar os produtos alimentares que melhor se adaptavam ao método Colilert® e verificar a versatilidade do método. Deste modo, selecionou-se previamente um conjunto de produtos alimentares que abrangiam as categorias de alimentos rececionadas pelo LMV (produtos de pastelaria, produtos cárneos crus, produtos da pesca crus, pratos prontos a comer e iogurtes). Estes produtos foram: bola de Berlim, carne de porco picada crua, dourada crua, salmão cru, camarão cozido, bacalhau com natas, arroz branco, sopa caldo-verde, salada de vegetais (alface e cenoura) e iogurte natural sólido. A seleção dos produtos alimentares decorreu entre os meses de Dezembro de 2012 e Fevereiro de 2013 e teve em consideração a Tabela 17 da seção 3.4., que considera os seguintes aspetos: (i) posicionamento da amostra na *tray*; (ii) cor dos poços da *tray* selado; (iii) possibilidade de leitura de resultados à luz UV. As análises destes foram efetuadas em paralelo utilizando os métodos Colilert®-18 e de referência para alimentos.

No primeiro ensaio de alimentos, ensaio 1, analisaram-se as matrizes bola de Berlim, arroz branco, carne de porco picada e dourada crua. Os produtos foram diluídos com *Buffered Peptone Water* (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Este diluente primário é usado como: (i) um meio não seletivo de pré-enriquecimento para a deteção de *Salmonella* em produtos alimentares e amostras ambientais e está de acordo com a norma EN ISO 6579 e Emenda A1; (ii) um diluente para a contagem de microrganismos e está em conformidade com as normas EN ISO 6887 e EN NP 8261; (iii) um diluente para a enumeração de *Listeria monocytogenes* e está de acordo com a norma EN ISO 11290-2. A *Buffered Peptone Water* contém uma mistura de peptonas que promovem o crescimento ideal dos microrganismos e em particular das enterobactérias (bioMérieux, 2007). A composição deste diluente primário encontra-se na Tabela 19. As peptonas conferem a este diluente uma cor acastanhada.

Tabela 19 – Constituição da *Buffered Peptone Water* (bioMérieux, 2007). NaCl - Cloreto de sódio; KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de potássio.

| Constituição da água peptonada tamponada | |
|---|-------|
| Peptona de caseína e gelatina (bovina ou suína) | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 9 g |
| Fosfato de potássio | 1,5 g |
| Água | 1 L |

Como já foi referido ao longo da introdução (seção 1.), *E. coli* (e os coliformes) possuem a enzima GAL que metaboliza o substrato ONPG, formando o ONP

(composto de cor amarelo). *E. coli* possui uma enzima adicional, a GUD que degrada o MUG, resultando num produto fluorescente perante luz UV: o 4-MU (Ndlovu, 2013). No entanto, a interpretação dos resultados pode ser influenciada pela turbidez ou a cor da amostra em análise, interferindo na visualização da cor amarela (amarelo mais pálido) e na fluorescência (fluorescência menos brilhante) (Bitton *et al.*, 1995). Neste primeiro ensaio de alimentos foi o que ocorreu. A cor acastanhada da peptona interferiu no brilho fluorescente dos poços de *E. coli*. Estes poços apresentaram pouco brilho, podendo mesmo ser confundidos com os poços não brilhantes, como foi na amostra da Figura 13 (carne de porco picada). Nas restantes amostras, não surgiram poços fluorescentes, portanto não se pode concluir nada sobre a cor. Mas, como salvaguarda para o restante estudo achou-se prudente a escolha de outro diluente primário.

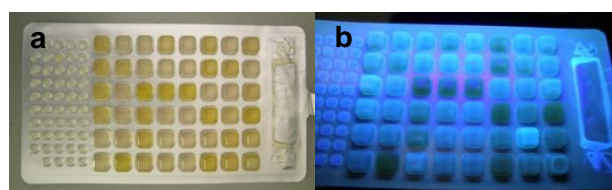


Figura 13 – a) Tray da carne de porco picada antes da incubação com poços amarelos característicos de coliformes. b) Tray da carne de porco picada depois da incubação com poços fluorescentes (com pouco brilho) característicos de *E. coli*. (Fotografias do autor).

Na tentativa de resolver a fraca fluorescência demonstrada na amostra da carne picada de porco, passou a utilizar-se como diluente *Peptone Water* a 1% cuja composição se apresenta na Tabela 20. Contudo, devido á cor de palha algo intensa que este diluente apresenta procedeu-se a uma diluição decimal dos seus constituintes, pois pretendia-se um meio de cultura primário incolor a fim de evitar interferência na leitura de resultados perante a luz UV.

Tabela 20 - Constituição da *Peptone Water* (Biokar Diagnostics, 2009). NaCl - Cloreto de sódio.

| Constituição da água peptona | |
|------------------------------|------|
| Peptona | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Água | 1 L |

O ensaio 2 consistiu no uso de *Peptone Water* a 0,1% como diluente dos mesmos alimentos testados no ensaio 1 (ou seja, a bola de Berlim, arroz branco, carne de porco picada crua e dourada crua). A tonalidade apresentada pelas amostras nas trays antes e depois da incubação apresentou-se muito mais clara e suave com *Peptone Water* a 0,1% do que com a *Buffered Peptone Water*. Pode-se afirmar que os poços apresentavam cores “neutras”, branco-acinzentado (no caso da bola de Berlim, arroz branco e dourada) e cor de salmão muito suave (no caso da carne de porco picada), Figura 14c e Figura 14d. Antes da incubação os poços com *Buffered Peptone Water* apresentavam tonalidades entre o amarelo (bola de Berlim, arroz branco e dourada) e o laranja escuro quase vermelho (carne de porco picada crua), Figura 14a. Após a incubação, apresentavam uma cor do amarelo claro (bola de Berlim, arroz branco e dourada) a amarelo (carne de porco picada) Figura 14b.

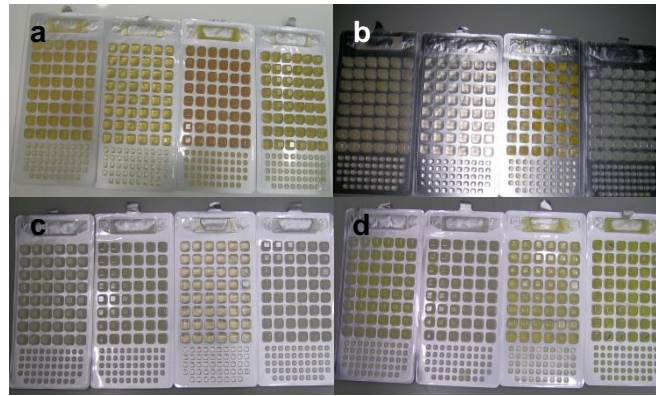


Figura 14 – a) Trays antes da incubação diluídos em *Buffered Peptone Water* apresentavam cores mais escuras em comparação com as trays diluídos em *Peptone Water* 0,1%. b) Trays depois da incubação diluídos em *Buffered Peptone Water* apresentavam cores um pouco mais escuras em comparação com as trays diluídas em *Peptone Water* 0,1%. c) Trays antes da incubação apresentavam cores muito claras/suaves diluídos *Peptone Water* a 0,1% em comparação com as trays diluído em *Buffered Peptone Water*. d) Trays depois da incubação diluídos em *Peptone Water* 0,1% apresentavam cores mais claras/suaves em comparação com as trays diluídos em *Buffered Peptone Water*. (Fotografia do autor).

A *Peptone Water* a 0,1% permitiu observar muito bem a fluorescência dos poços. Os poços apresentavam um brilho particularmente intenso, quer os grandes quer os pequenos, o que permitiu uma excelente diferenciação entre os poços positivos e os negativos (ausência de fluorescência) (Figura 15). Portanto, a utilização de outro diluente, que não a *Buffered Peptone Water*, foi uma boa opção.

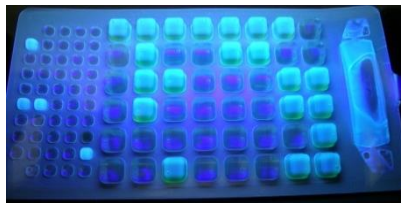


Figura 15 – Poços indicadores da presença de *E. coli* (em carne de porco picada) através da fluorescência particularmente perceptível e notória dos restantes. (Fotografia do autor).

O último ensaio da presente etapa (ensaio 3) foi realizado em salmão cru, camarão cozido, bacalhau com natas, sopa caldo-verde e iogurte natural sólido. Utilizou-se como diluente a *Peptone Water* a 0,1%. Infelizmente, neste último ensaio de alimentos não foi possível avaliar a fluorescência dos poços, pois as amostras não apresentavam *E. coli*. Facto comprovado pela ISO 16649-2 (2001), ou seja, o método de referência. Apenas foi possível avaliar o posicionamento da amostra na tray e a coloração dos poços.

A sopa caldo-verde (Figura 16) e o iogurte sólido natural (Figura 17) apresentaram cores claras e suaves antes e após a incubação, sem qualquer falha no posicionamento da amostra na tray. No entanto, o salmão, o camarão e o bacalhau com natas apresentaram problemas tanto no posicionamento da amostra na tray (salmão e bacalhau com natas) como na leitura dos resultados (camarão). Após a incubação surgiram os seguintes problemas: (i) no salmão - sedimentos em precipitação, Figura 18; (ii) no bacalhau com natas - amostra dispersou-se dos poços grandes para a restante estrutura da tray, Figura 19; (iii) no camarão cozido - salinidade pode ter contribuído para se obter uma tray com todos os poços fluorescentes, ou seja com o valor máximo de *E. coli* detetável pelo método Colilert®

(sem diluições), uma vez que o camarão já se encontrava temperado com sal. No método de referência não foi detetado nenhuma contagem de *E. coli*, portanto o resultado obtido com o método Colilert[®] é um falso-positivo. De facto existem estudos efetuados que mencionam o Colilert[®] como um método que não funciona em ambiente salino (Tryland *et al.*, 2010). Mas, a origem da fluorescência pode não estar no sal e sim na autofluorescência emitida pelo camarão. Alguns produtos da pesca, incluindo o camarão, podem exibir autofluorescência a 366 nm perante a luz UV (Venkateswaran *et al.*, 1996).



Figura 16 – a) *Tray* da sopa caldo-verde antes da incubação. b) *Tray* da sopa caldo-verde após a incubação. (Fotografias do autor).



Figura 17 - a) *Tray* do iogurte sólido natural antes da incubação. b) *Tray* do iogurte sólido natural após a incubação. (Fotografias do autor).

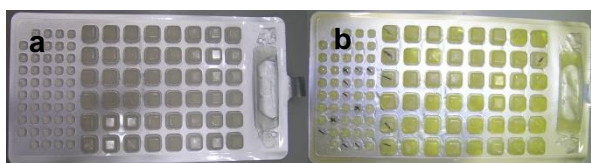


Figura 18 - a) *Tray* do salmão antes da incubação. b) *Tray* do salmão após a incubação. (Fotografias do autor).

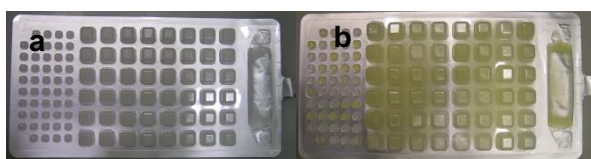


Figura 19 - a) *Tray* do bacalhau com natas antes da incubação. b) *Tray* do bacalhau com natas após a incubação. (Fotografias do autor).

Nem todos os produtos alimentares estudados na fase 1 foram selecionados para a continuação do estudo prático. A carne de porco picada crua foi a única matriz alimentar em que se conseguiu avaliar a funcionalidade do método. Pois foi o único alimento que possuiu *E. coli*, possibilitando a avaliação da leitura dos resultados. O salmão cru e o bacalhau com natas foram os outros alimentos eliminados. Ambos apresentaram problemas no posicionamento da amostra nos poços da *tray*, devido à constituição dos alimentos. Porém, a bola de Berlim, a dourada crua, o arroz branco, a salada de vegetais e o iogurte natural sólido corresponderam ao pretendido, exceto na

leitura de resultados, pois os alimentos não continham *E. coli*. Estes resultados são corroborados não só pelo método de referência, mas também com o histórico do Laboratório que os analisa há vários anos (estes produtos por norma não estão contaminados por este microrganismo). Assim, os alimentos selecionados para a fase seguinte (fase 2) foram de acordo com a Tabela 21: a bola de Berlim, a carne picada de porco crua, a dourada crua; o arroz branco, a sopa caldo-verde, a salada de vegetais crus (alface e cenoura) e o iogurte natural sólido.

Tabela 21 - Alimentos avaliados para análise com o método Colilert®.
 ✓ Cumpre; X Não cumpre; NA Não avaliado.

| | Posicionamento da amostra na <i>tray</i> | | Cor poços na <i>tray</i> | Leitura dos resultados (luz UV) | | |
|---------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------|---------|
| | Amostra espalhada homogeneamente | Ausência partículas alimentos | Cor clara/suave dos poços | Fluorescência perceptível/notória dos poços | Facilidade de distinção dos poços | Seleção |
| Bola de Berlim | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |
| Carne de porco picada crua | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Dourada crua | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |
| Salmão cru | X | X | ✓ | NA | NA | X |
| Camarão cozido | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | NA | X |
| Bacalhau com natas | X | X | ✓ | NA | NA | X |
| Arroz branco | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |
| Sopa caldo-verde | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |
| Salada de vegetais (alface e cenoura) | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |
| logurte natural sólido | ✓ | ✓ | ✓ | NA | NA | ✓ |

4.2. Fase 2: Apreciação da exatidão do método Colilert®

A segunda fase teve como objetivo conhecer a exatidão do método Colilert®. Para tal, contaminaram-se artificialmente amostras alimentares com cerca de 2 log/g de *E. coli* e observou-se posteriormente as respostas do teste Colilert® e do método de referência. Os produtos alimentares (selecionados na fase 1) foram contaminados artificialmente com a estirpe de *E. coli* (ATCC 25922). Foram estudadas três réplicas para cada produto. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados obtidos pelo método Colilert® e método de referência em produtos alimentares contaminados artificialmente no estudo de exatidão. Log - Logaritmo de base decimal; N - Número de microrganismos; UFC - Unidades formadoras de colónias.

| | Colilert® | Método de referência |
|-------------------------------------|-----------|----------------------|
| | Log N/g | Log UFC/g |
| Bola de Berlim 1 | 2,27 | 2,50 |
| Bola de Berlim 2 | 2,01 | 2,45 |
| Bola de Berlim 3 | 2,02 | 2,43 |
| Carne picada de porco crua 1 | 2,01 | 2,30 |
| Carne picada de porco crua 2 | 2,31 | 2,32 |
| Carne picada de porco crua 3 | 2,22 | 2,46 |
| Dourada crua 1 | 2,30 | 2,18 |
| Dourada crua 2 | 2,32 | 2,18 |
| Dourada crua 3 | 2,06 | 2,23 |
| Sopa caldo-verde 1 | 2,27 | 2,38 |
| Sopa caldo-verde 2 | 2,10 | 2,32 |
| Sopa caldo-verde 3 | 2,23 | 2,36 |
| Salada de vegetais crus 1 | 1,72 | 1,70 |
| Salada de vegetais crus 2 | 1,53 | 1,48 |
| Salada de vegetais crus 3 | 1,68 | 1,60 |
| logurte sólido natural 1 | 2,29 | 2,23 |
| logurte sólido natural 2 | 2,08 | 2,14 |
| logurte sólido natural 3 | 2,13 | 2,18 |

Considerando a Tabela 22, a diferença entre os resultados do Colilert® e os do método de referência foram sempre inferiores a 0,5 log/g. Esta diferença é mínima pelo que se considerou não ser necessário elaborar uma análise estatística. Os resultados dos dois métodos encontram-se na mesma ordem de grandeza e, como tal, foram considerados semelhantes.

Em numerosos estudos de validação do método Colilert® para análise de águas não foram encontradas diferenças significativas entre o Colilert® e a filtração por membrana (FM), e o Colilert® e a fermentação de tubos múltiplos (FTM). Descrevem-se em seguida alguns desses ensaios.

Kinzelman *et al.* (2005) realizaram durante um período de 2 anos um estudo de comparação de dois métodos: (i) Colilert®; (ii) FM aprovado *United States Environmental Protection Agency* (USEPA). Este estudo consistiu na determinação quantitativa de *E. coli* em amostras de praias de água doce. A análise não indicou nenhuma diferença significativa entre os conjuntos de dados obtidos com estas metodologias. Portanto, concluíram que o Colilert® era uma boa opção para a implementação em análise de água

doce. Macy *et al.* (2005) também chegaram à mesma conclusão num estudo onde compararam na prática o Colilert® e a FM na detecção e enumeração de coliformes totais e *E. coli*, utilizando 35 amostras de água potável. Em outro estudo efetuado por Buckalew *et al.* (2006) chegaram à mesma conclusão que os anteriores. As amostras em análise foram da água de um rio. A colheita foi feita mensalmente durante três anos.

Kramer e Liu (2002) estudaram a aplicabilidade do Colilert® para enumeração de coliformes em águas residuais. Para tal, compararam o Colilert® com a FTM. Os resultados mostram que os métodos são iguais para todas as amostras testadas. As contagens de *E. coli* pelo método FTM foram semelhantes às contagens obtidas com o Colilert®.

Outros estudos relataram diferenças entre o Colilert® e a FM e o Colilert® e a FTM. Em seguida são descritos alguns desses estudos.

Niemela *et al.* (2003) investigaram o uso do método FTM e do método Colilert® com amostras de água potável oriundas de 20 laboratórios de 13 países europeus. Os resultados do estudo mostraram que o Colilert® detetava um número significativamente maior de coliformes e *E. coli* do que o procedimento de referência. No caso da *E. coli*, as recuperações também foram mais elevadas quando utilizaram o Colilert® e a diferença observada foi significativa. Em outro estudo, 24 locais de amostragem de água doce (11 rios, 6 águas de nascentes e 7 águas subterrâneas) foram selecionados a partir de 4 áreas de amostragem localizadas nas regiões norte e central de Taiwan. Um total de 125 amostras de água foram coletadas durante um período de amostragem de cinco meses. Em média 94% e 80% das amostras de água avaliadas com o método Colilert® continham coliformes totais (e *E. coli*) respetivamente nos 2 métodos. Os dados indicaram que o método FM é inadequado para a contagem de coliformes em amostras de água subtropicais, mas o Colilert® é uma ótima opção para este tipo de amostra (Chao *et al.*, 2003). Mais recentemente, Valente *et al.* (2010) compararam as duas metodologias em águas recreativas. O Colilert® apresentou melhores resultados do que a FM. Porém, concluíram que são precisos mais estudos para avaliar a precisão e exatidão do Colilert®, a fim de aplica-lo ao monitoramento de rotina das águas doces e salgadas das zonas balneares recreativas. Warden *et al.* (2011) coletaram amostras de dez diferentes estações de tratamento de águas residuais no nordeste dos EUA e foram testadas em um único laboratório. Vinte repetições de cada amostra foram analisadas por cada método (FM e Colilert®). A recuperação de coliformes fecais por Colilert®-18 foi significativamente maior do que a recuperação pelo método de referência para amostras de todos, menos um local. As taxas de precisão dos dois métodos foram calculados como 96,5% e 88,9 % para os métodos Colilert®-18 e o método de referência, respetivamente.

Dois métodos alternativos, um meio de cultura cromogénio (m-ColiBlu24) e o Colilert®-18 foram comparados com o método FM por Bernasconi *et al.* (2006). Os resultados mostraram que o FM não conseguiu detetar uma importante percentagem de coliformes e *E. coli*. Bonadonna *et al.*, (2007) estudaram o método FTM com um meio de cultura cromogénio e o Colilert® e concluíram precisamente o mesmo: o Colilert® foi capaz de detetar, qualitativamente e quantitativamente, uma maior proporção de *E. coli*. Além disso, a hidrólise do MUG parece ser um processo mais adequado para a identificação de microrganismo(s) alvo. A seletividade do método de referência combinada com as etapas

de confirmação seletivas resultou em contagens mais baixas de *E. coli*. O Colilert® mostrou ser mais sensível do que o procedimento de referência. Horman e Hanninen (2006) compararam a FM com mais métodos do que os autores anteriores. A comparação foi feita com a FTM, Colilert®-18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check 100, 3M Petrifilm EC e DryCult coli em águas. O método Colilert®-18 foi dos métodos que apresentou uma diferença significativa maior para *E. coli* em comparação com o método de clássico. O objetivo do estudo realizado por Sousa *et al.* (2010) foi testar a especificidade do método Colilert® para detecção de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água do mar de águas pluviais de uma cidade costeira (Fortaleza, Brasil), em comparação com os resultados obtidos com o método FTM. Os resultados obtidos para *E. coli* pelo Colilert® foram muito mais elevados, mostrando que o Colilert® detecta melhor *E. coli* neste tipo de amostras que o FTM. Girambagedara e Mannapperuma (2010) compararam o desempenho de três métodos alternativos com o método FTM em diferentes águas tropicais. Os métodos alternativos incluem o Colilert® e o m-ColiBlue24 e o método de FM. Água mineral, água de poço, águas superficiais e efluentes de águas residuais (75 amostras) foram examinadas pelos quatro métodos. O estudo revelou que o Colilert® pode ser recomendado como método alternativo para a análise de amostras de água potável e de superfície. Em suma, o Colilert® constitui uma alternativa ao método de referência de detecção de coliformes e *E. coli* em análises de águas de diferentes origens e com pouca matéria orgânica.

No entanto, existem algumas investigações que apontam o Colilert® como um método menos preciso para a enumeração de *E. coli* em águas. Schets *et al.* (2002) comparou a FM com o Colilert®-18 e outros métodos alternativos. O método de referência é adequado para a análise de amostras de água muito limpa e o Colilert®-18 é apresentado neste estudo como uma alternativa. Mas, produziu contagens mais baixas e resultados falso-negativos. Pitkänen *et al.* (2007) também efetuaram um estudo comparativo com o método de referência e métodos alternativos, inclusive o Colilert®, mas em amostras de água não desinfetada. Foi utilizado um total de 110 amostras de águas subterrâneas, águas balneares e águas cravado. Na maioria dos casos Colilert® deu maiores contagens de coliformes que o método de referência. Por outro lado, o uso da FM conduziu a maiores contagens de *E. coli*. Os níveis de contaminação dos dois sistemas de rio foram avaliados pela Colilert®-18, FM e FTM por Ndlovu (2013). Observou-se que a técnica de FTM foi a mais sensível e obteve mais altas contagens para a maioria das amostras. No entanto, FM também recuperou eficazmente as células microbianas ambientalmente em *stress* e também foi melhor para a seleção de rotina e crescimento de coliformes e *E. coli*. Foi demonstrado que as diluições das águas altamente poluídas aumentam a precisão do sistema Colilert®-18 para enumerar coliformes e *E. coli* em águas marinhas. O que poderá indicar que o método não será muito adequado para ambientes com elevada matéria orgânica.

Todos estes estudos apresentados compararam o Colilert® com métodos utilizados na enumeração de *E. coli* em águas. Mas, existe um estudo levado a cabo por Jorquera (2011) que compara o Colilert® com um dos métodos de referência (FTM) para a enumeração de *E. coli* em alimentos. A matriz alimentar em análise foram os moluscos bivalves (*Mytilus spp* e *Ruditapes decussatus*). Com o Colilert®-18 verificou-se que os resultados foram concordantes com os resultados obtidos pelo método clássico. Os

resultados sugerem a existência de uma correlação positiva entre os dois métodos, com ambas as espécies de moluscos bivalves, particularmente com *Mytilus* spp que não apresentou diferenças significativas no processo de quantificação de coliformes totais e *E. coli*. No entanto, a espécie *Ruditapes decussatus* revelou diferenças significativas somente na quantificação de *E. coli*, sugerindo a ocorrência de falso-negativos pelo Colilert®.

A fluorescência dos poços, neste estudo, era unânime na mesma *tray* e entre *trays*, ou seja, os poços apresentavam a mesma elevada intensidade de brilho. Contudo, este excelente resultado poderá ter sido devido ao facto da *E. coli* inoculada no alimento ser uma estirpe modelo (de coleção) e não uma estirpe de *E. coli* selvagem habituada a competir com muitos outros microrganismos diferentes. Talvez o resultado fosse diferente se o alimento estiver naturalmente contaminado com *E. coli* selvagem e em *stress*.

4.3. Fase 3: Observação da recuperação de *E. coli* naturalmente presente em alimentos

Na última fase pretendeu-se observar a recuperação de *E. coli* naturalmente presente no alimento e em *stress*. Para tal, utilizou-se carne de porco picada pois este alimento, de acordo com o histórico do Laboratório, apresenta com frequência *E. coli* e em grande número. Estudaram-se 17 amostras diferentes, sendo estas designadas pela letra “C” (correspondente a “carne de porco picada”) e pelo número da amostra (exemplo 2). O *stress* imposto á *E. coli* (naturalmente presente nas amostras de carne de porco picada) foi a congelação. Assim, todas as amostras foram congeladas (- 18° C) durante 16 horas, tal como efetuou no seu estudo Clavero e Beuchat (1995), tendo sido analisadas antes (com o método de referência) e depois da congelação (com o método de referência e o Colilert®). Os resultados obtidos antes e após a congelação são apresentados na Tabela 23.

Conforme Tabela 23, antes da congelação todas as amostras estavam naturalmente contaminadas por *E. coli*. A amostra C12 apresentou a maior contaminação (2,79 log/g). O resultado mais baixo encontrado foi de 1,00 log/g (C8). Estes resultados concordam com o histórico do Laboratório.

Tabela 23 - Resultados obtidos pelo método Colilert[®] e método de referência em produto alimentar naturalmente contaminado. N - Número de microrganismos; UFC - Unidades Formadoras de Colônias; ----- - Não apresentou contagens.

| | Antes da congelação | | Após a congelação | |
|------------|----------------------|--|----------------------|-----------------------|
| | Método de referência | | Método de referência | Colilert [®] |
| | Log UFC/g | | Log UFC/g | Log N/g |
| C1 | 1,80 | | 1,70 | 1,52 |
| C2 | 2,18 | | 1,95 | 1,30 |
| C3 | 1,60 | | ----- | 0,78 |
| C4 | 1,70 | | 1,00 | 1,04 |
| C5 | 2,04 | | 1,70 | 1,96 |
| C6 | 2,43 | | 2,24 | 1,84 |
| C7 | 2,58 | | 2,12 | 1,57 |
| C8 | 1,00 | | ----- | 1,0 |
| C9 | 1,70 | | ----- | 0,67 |
| C10 | 2,15 | | 1,70 | 0,78 |
| C11 | 2,60 | | 2,32 | 1,45 |
| C12 | 2,79 | | 2,19 | 1,32 |
| C13 | 1,95 | | ----- | 0,85 |
| C14 | 1,95 | | ----- | 0,78 |
| C15 | 2,60 | | 2,26 | 1,36 |
| C16 | 2,32 | | 2,18 | 1,20 |
| C17 | 2,52 | | 2,38 | 1,49 |

Após as 16 horas de congelação da carne picada, a contaminação baixou em todas as amostras. Até se observaram amostras nas quais não foi possível detetar *E. coli* (C3, C8, C9, C13 e C14). Considerando a Tabela 23, a C17 é a amostra onde ocorreu a maior recuperação (2,38 log/g), seguida da C11 (2,32 log/g) e da C12 (2,19 log/g).

Após congelação, ao comparar as contagens obtidas com o método Colilert[®] e as obtidas com o método de referência, verificou-se que este último originou contagens superiores em 58,8% (10/17) das amostras, contudo este número não é suficiente para afirmar uma melhor recuperação pois a diferença dos dois métodos foi sempre inferior a 1 log/g e não foi estatisticamente significativa ($p \geq 0,5$). Além do mais o Colilert[®] possibilitou a recuperação de algumas células de *E. coli*, em 29,4% (5/17) das amostras (C3, C8, C9, C13 e C14) nas quais o método de referência não conseguiu recuperar nenhuma. O Colilert[®] conseguiu enumerar até mesmo 1 microrganismo/g (C8), devido à alta sensibilidade do substrato MUG na deteção de *E. coli*, apresentando por isso este método um baixo limite de deteção. Observação que coincide com o apontado por Shash *et al.* (2010). Tal aconteceu na investigação de Berger (2008). Este autor mostrou que Colilert[®] recupera números baixos (< 4/100 mL) de *E. coli* em *stress*. Anteriormente, esta sensibilidade para baixos números microbianos já tinha sido documentada por Niemela *et al.* (2003).

No presente ensaio, o Colilert[®] conduziu a semelhante recuperação comparativamente com o método de referência mas demonstrou um menor limite de deteção. Estes resultados concordam com os de Eccles *et al.* (2004), Muirhead *et al.* (2004) e Hallas *et al.* (2008). Muirhead *et al.* (2004) apresentou resultados em que o Colilert[®] foi ligeiramente melhor a recuperar células em *stress* do que um outro método. Efetuou um estudo com objetivo de determinar se um método de substrato definido, Colilert[®], poderia

ser utilizado como um meio eficaz e preciso de enumeração de *E. coli* em amostras de fezes e amostras de solo. Para tal, foram analisadas amostras contaminadas artificialmente com *E. coli* e amostras com populações naturais de *E. coli* nas fezes de vaca. O número de *E. coli* recuperado a partir das fezes e amostras de solo usando o Colilert® e o NMP foram comparadas. O Colilert® foi significativamente mais preciso do que o método de NMP. Os resultados das amostras contaminadas artificialmente indicaram que os dois métodos utilizados neste estudo eram semelhantes na sua capacidade para recuperar um número conhecido de *E. coli* a partir de diferentes matrizes. O estudo demonstrou que o meio Colilert® pode ser utilizado para uma vasta gama de amostras do meio ambiente com elevado e baixo teor de sólidos.

A recuperação de *E. coli* pelo Colilert® não é surpreendente. Eccles *et al.* (2004) examinou três métodos analíticos (dois métodos de FM e o Colilert®) para isolamento e enumeração de *E. coli* a partir de lamas de esgoto tratadas. Os métodos demonstraram uma boa e consistente recuperação de *E. coli* para uma série de amostras diferentes de esgotos tratados. Os métodos conduziram a recuperações comparáveis e não variaram em mais de uma ordem de grandeza (1 log), apesar do Colilert® ter demonstrado melhores resultados.

Hallas *et al.* (2008) comparou três métodos (método de contagem de placas, FM com ágar cromogénico e Colilert®) para análise de água potável (tratada com cloro) e não potável na Austrália. Ambas as águas foram analisadas ao longo de um período de 12 meses. A recuperação de microrganismos em *stress* foi favorecida no sistema Colilert®-18 quando comparado com meios de cultura cromogénicos. As bactérias tornam-se sensíveis ao processo de FM e são suscetíveis à desidratação sobre a superfície da membrana, em particular se houver danos da membrana celular, exercida por desinfetantes comuns, e o estudo indicou que o Colilert®-18 pode ajudar na recuperação destes organismos.

No entanto, Wohlsen *et al.* (2006) obtiveram resultados diferentes de Hallas *et al.* (2008) num ensaio no qual utilizaram técnicas seletivas (MF, Colilert®, NMP e Petrifilm) e não seletivas (contagem em placa) para avaliar o desempenho das bactérias BioBall™. As bactérias foram submetidas a azoto líquido e liofilização antes do teste. A adição de meio quente fundido (45° C) na contagem de placa pode causar *stress* aos microrganismos, o que resulta numa diminuição da recuperação. No entanto, este estudo não demonstrou isto. Os melhores e mais consistentes resultados foram obtidos com Petrifilm e o método de contagem de placa. Os outros métodos ou renderam uma baixa recuperação ou mostraram significativamente alta variabilidade entre as repetições, como foi o caso do Colilert®.

A fluorescência dos poços não foi uniforme em toda a *tray*, isto é, existiram poços com brilho mais intenso que outros. Como o Colilert® não recuperou devidamente as células em *stress* impediu algumas de imitirem a devida fluorescência. E até, por vezes, existiu o aparecimento de poços de verdes fluorescentes. Ao serem confirmados em meio de cultura TBX estes poços tinham *E. coli*. No presente estudo também foram observados poços com fluorescência verde em todas as amostras de carne de porco picada crua. Nos restantes produtos não ocorreu esse aparecimento. Provavelmente, poderá estar relacionado com a constituição da carne.

4.4. Aspectos gerais do método Colilert®

4.4.1. Confirmação de resultados

Kilian e Bulow em 1976 mostraram pela primeira vez a associação da enzima GUD à *E. coli* (Azad *et al.*, 2003). A GUD mostrou estar presente em 94-97% das estirpes de *E. coli*, *Shigella* spp. (44-50%) e *Salmonella* spp. (17-29%). *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter intermedium*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Serratia fonticola*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp. são microrganismos produtores de GUD (Alonso *et al.*, 1996). O Colilert® tem como base o substrato definido MUG para a detecção de *E. coli* e o MUG é degradado pela enzima GUD, a presença de outro microrganismo para além a *E. coli* pode originar resultados falso-positivos. Assim, a presença de falso-positivos pode ocorrer quando há abundância suficiente de bactérias não-alvo, ou seja, bactérias que enzimaticamente decompõe os substratos cromogénicos ou fluorogénicos (Sercu *et al.*, 2010). Um resultado falso-positivo de *E. coli* em Colilert® é o aparecimento de um (ou mais) poço amarelo que exibe fluorescência azul mas a partir da qual nenhuma *E. coli* é detetada. Ou seja, corresponde a microrganismos que não são *E. coli* que produzem fluorescência. Por outro lado, o resultado falso-negativo é definido como amostras que embora possuam *E. coli* não originam fluorescência azul.

Durante o trabalho prático, todos os poços positivos e negativos de *E. coli* foram confirmados com o método de referência. Mas, nenhuma amostra apresentou resultados falso-positivos e falso-negativos pelo método Colilert®. Valente *et al.* (2010) não relatou falso-positivos nem falso-negativos no seu estudo. No entanto, alguns autores constataram o aparecimento de resultados falso-positivos e falso-negativos em análise de águas. Kämpfer *et al.* (2008) relatou uma taxa de falso-positivos de 1-5%. Trottier (2008) mostrou o aparecimento de 5 falso-positivos e 11 falso-negativos em 218 amostras. Chao *et al.* (2004) apresentou 7,4% de falso-positivos e 3,5% de falso-negativos. Dois anos mais tarde Chao (2006) constatou o aumento de falso-positivos para 36,4% e falso-negativos para 11%. Mais recentemente, Luyt *et al.* (2012) relatou valores de falso-positivos de 7,4% a 36,4%. Ao mesmo tempo, a taxa de resultados falso-negativos varia de 3,5% a 12,5%. Brassill (2013) constatou uma taxa de falso-positivos elevada para cada método em análise. O MI Agar, o m-ColiBlue24® e o Colilert® apresentaram uma precisão de 67%, 72% e 51%, respetivamente, em águas de irrigação no Arizona e Califórnia. 8,9% das águas de praia estudadas por Oliveira *et al.* (2012) conduziram a falso-positivos, 7 foram identificados como *Enterobacter cloacae*, 2 como *Citrobacter* spp., 2 como *Enterobacter intermedium* e 1 para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* spp. e *Escherichia vulneris*. Pisciotta *et al.* (2002) mencionou o aparecimento de *Providencia* spp.. Sousa *et al.* (2010) não detetou falso-negativos em águas tropicais, mas 9 Vibrionaceae (4 *Vibrio* spp. (14.8%), 3 *Vibrio fluvialis* (11.2%) e 2 *Vibrio alginoliticus* (7.4%)) e 6 Aeromonadaceae (2 *Aeromonas* spp. (7.4%), 2 *Aeromonas veronii* (7.4%), 1 *Aeromonas eucrenophila* (3.7%) e 1 *Aeromonas caviae* (3.7%)). Kodaka *et al.* (2008) também não detetou falsos-negativos, mas sim falsos-positivos. Eccles *et al.* (2004) referiu que a taxa de falso-positivos e falso-negativos foi baixa, < 3% e 3,81% respetivamente. Warden *et al.* (2011) ao analisar águas residuais detetou também uma

taxa de falso-positivos muito baixa (< 2%). A taxa de falso-negativos observado pelo método de referência (21,5%) foi substancialmente mais elevada do que a observada com Colilert[®]-18 (7%). Aproximadamente 30% de poços amarelos não fluoresceram e apresentavam *E. coli* quando confirmados. Schets *et al.* (2002) também relatou uma observação similar, nos seus resultados 11% de poços amarelos continham *E. coli*. Fricker *et al.* (2008) detetou uma taxa um pouco mais elevada, cerca de 12,5 % de falso-negativos.

O método Colilert[®] é apresentado como sendo um método que não necessita de etapas de confirmação (Martin, 2013). Apesar, de existirem muitos autores que mostraram o contrário, como foi relatado anteriormente. Efetivamente este estudo indica que poderá não ser necessário executar confirmações após a análise no Colilert[®], mas foram estudadas um número muito reduzido de amostras.

4.4.2. Comparação entre meios de cultura

Cada microrganismo deve encontrar no seu ambiente todas as substâncias necessárias para a produção de energia celular e biossíntese. *E. coli* é uma bactéria heterotrófica, pois utiliza compostos orgânicos para produzir carbono celular (Madigan *et al.*, 1996). No entanto, a glicose é a fonte de carbono preferida (Martínez-Gómez *et al.*, 2012). Os produtos químicos e os elementos do ambiente utilizados para o crescimento bacteriano são referidos como nutrientes ou requisitos nutricionais (Todar, 2004). O crescimento bacteriano é limitado pela disponibilidade dos nutrientes (Peterson *et al.*, 2005). Os nutrientes essenciais para o crescimento de *E. coli* são: C (carbono), H (hidrogénio), O (oxigénio), N (azoto), S (enxofre), P (fósforo), K (potássio), Mg (magnésio), Fe (ferro), Ca (cálcio). As funções fisiológicas gerais destes elementos estão descritas na Tabela 24. Mn (manganês) e vestígios de Zn (zinco), Co (cobalto) e Cu (cobre) são iões metálicos necessários em quantidades tão pequenas que é difícil detetar (quantificar) e não é necessário adicioná-los aos meios de cultura como nutrientes. São necessárias quantidades tão pequenas que estão presentes como "contaminantes" dos componentes do meio ambiente. Estes iões vestigiais geralmente atuam como cofatores para as reações enzimáticas essenciais das células. Todos os elementos encontram-se sob a forma de água, iões inorgânicos, pequenas moléculas e macromoléculas que têm um papel estrutural ou funcional nas células (Todar, 2004).

Assim, é essencial que os meios de cultura para a enumeração ou deteção de microrganismos, neste caso *E. coli*, reúnam todos os nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento. O meio de cultura Colilert[®] (Tabela 25) teve em conta alguns destes requisitos nutricionais. Através do composto $(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$ o meio de cultura fornece energia, N e S, permitindo fornecimento N a aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos e coenzimas, e de S para a constituição de cisteína, metionina, glutamina e várias coenzimas. O P é fornecido por dois compostos, o KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . Este elemento é essencial para a constituição de ácidos nucleicos, nucleótidos e fosfolipídios. O Mg é dado pelo MgSO_4 e Ca pelo CaCl_2 . Ambos são fundamentais para a constituição de catiões celulares inorgânicos e cofatores para reações enzimáticas. Ainda é facultado Mn e o Zn, pelo $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$ e o ZnSO_4 , respetivamente. Por outro lado, o Colilert[®] não disponibiliza o C, O, H, K e Fe. Estes elementos são fornecidos pelas amostras.

O meio de cultura Colilert[®] contém por litro os seguintes constituintes, Tabela 25: $(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$ (sulfato de tetraamina), $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$ (sulfato de manganês), ZnSO_4 (sulfato de zinco), MgSO_4 (sulfato de manganês), NaCl (cloreto de sódio), CaCl_2 (cloreto de cálcio), KH_2PO_4 (hidrogenofosfato de potássio), Na_2HPO_4 (fosfato dissódico), Na_2SO_3 (sulfito de sódio), anfotericina B, ONPG, MUG e *Solanium* (Edberg *et al.*, 1988). Porém, no mesmo ano foi apresentando um estudo onde a esta composição foi acrescentado 50 mg de Tween 80 (Edberg e Edberg, 1988).

O meio de cultura TBX (Tabela 26) possui como principal componente a triptona. É um preparado a partir de um digerido pancreático de caseína (Clarke *et al.*, 2001). A caseína é a principal proteína do leite e é uma rica fonte de azoto de aminoácido. A triptona é rica em triptofano, tornando útil na detecção de produção de indol. A ausência de níveis detetáveis de hidratos de C na triptona torna uma peptona adequado para diferenciar as bactérias em função da sua capacidade para fermentar diferentes hidratos de carbono (Oxoid, 2013). *E. coli* a partir deste composto vai conseguir obter C, S e nutrientes.

Os sais biliares nº 3 são o colato de sódio e desoxicolato de sódio (Bidlack e Silverman, 2004). Estes inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e ajudam a recuperar *E. coli* (Thanassi e Cheng, 1997).

Para concluir, e para além dos nutrientes referidos, o meio Colilert[®] possui o componente fundamental á detecção enzimática como o MUG, enquanto o meio TBX possui o BCIG. Este substrato permite a detecção cromogénica dos microrganismos, em vez da detecção fluorogénica pelo MUG. Conforme referido várias vezes, ambos são utilizados pela GUD.

Tabela 24 - Principais elementos, suas fontes e funções em células bacterianas (Todar, 2004). C – Carbono; O - Oxigênio; N – Azoto; S – Enxofre; P – Fósforo; K – Potássio; Mg – Magnésio; Fe – Ferro; Ca – Cálcio; CO₂ - Dióxido de carbono; H₂O – Água; O₂ – Oxigênio; NH₃ – Amoníaco; NO₃ – Nitrato; N₂ – Azoto; H₂ - Hidrogênio; PO₄ – Fosfato; SO₄ – Sulfato; H₂S – Sulfato de hidrogênio; SO – Dióxido de enxofre.

| Elemento | Quantidade (%) | Fonte | Função |
|-----------------|-----------------------|---|---|
| C | 50 | Compostos orgânicos ou CO ₂ . | Constituinte principal do material celular. |
| O | 20 | H ₂ O, compostos orgânicos, CO ₂ e O ₂ . | Constituinte do material celular; O ₂ é recetor de elétrons na respiração aeróbia. |
| N | 14 | NH ₃ , NO ₃ , compostos orgânicos, N ₂ . | Constituinte de aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos e coenzimas. |
| H | 8 | H ₂ O, compostos orgânicos, H ₂ . | Constituinte principal de compostos orgânicos e água da célula. |
| P | 3 | PO ₄ inorgânicos. | Constituinte de ácidos nucleicos, nucleótidos e fosfolipídios. |
| S | 1 | SO ₄ , H ₂ S, SO e compostos orgânicos de S. | Constituinte de cisteína, metionina, glutamina e várias coenzimas. |
| K | 1 | Sais de K. | Catião celular inorgânico e cofator para certas enzimas. |
| Mg | 0,5 | Sais de Mg. | Catião celular inorgânico e cofator para certas reações enzimáticas. |
| Ca | 0,5 | Sais de Ca. | Catião celular inorgânico e cofator para certas enzimas. |
| Fe | 0,2 | Sais de Fe. | Componente de citocromos e cofatores para algumas reações enzimáticas. |

Tabela 25 - Composição do meio de cultura Colilert[®]. (NH₂)₄SO₄ - Sulfato de tetraamina; Mn(SO₄)₂ - Sulfato de manganês; ZnSO₄ - Sulfato de zinco; MgSO₄ - Sulfato de manganês; NaCl - Cloreto de sódio; CaCl₂ - Cloreto de cálcio; KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de potássio; Na₂HPO₄ - Fosfato disódico; Na₂SO₃ - Sulfito de sódio; N – Azoto; S – Enxofre; Mn – Manganês; Zn – Zinco; Mg – Magnésio; Na- Sódio; Ca – Cálcio; PO₄ – Fosfato.

| Composto | Quantidade por L | Função |
|---|------------------|---|
| (NH ₂) ₄ SO ₄ | 5 g | Fonte de energia (Hommes <i>et al.</i> , 2003), N e S (Shehata e Marr, 1971). |
| Mn(SO ₄) ₂ | 0,5 µg | Fonte de Mn (Enrlich, 1962). |
| ZnSO ₄ | 0,5 µg | Fonte de Zn (Shipe e Fields, 1956). |
| MgSO ₄ | 100 mg | Fonte de Mg (Nelson e Kennedy, 1972). |
| NaCl | 10 g | Fonte de Na (MacLeod, 1965). |
| CaCl ₂ | 50 mg | Fonte de Ca (Evans, 1969). |
| KH ₂ PO ₄ | 900 mg | Fonte de PO ₄ (Pokorny e Cimerman, 1994). |
| Na ₂ HPO ₄ | 6,2 g | Fonte de PO ₄ (Lay e Lin, 2004). |
| Na ₂ SO ₃ | 40 mg | Fonte de Na (Argent <i>et al.</i> , 2007). |
| Anfotericina B | 2 mg | Antibiótico usado para inibir células de leveduras (Argent <i>et al.</i> , 2007). |
| ONPG | 500 mg | Substrato fluorogénico detetado pela atividade da enzima GAL dos coliformes. |
| MUG | 75 mg | Substrato fluorogénico detetado pela atividade da enzima GUD da <i>E. coli</i> . |
| <i>Solanium</i> | 50 mg | Extrato da planta <i>Solanum</i> que atua como emulsificante (Jorquera, 2011). |
| Tween 80 | 50 mg | Composto não-iônico. Permite a dispersão (Edberg e Edberg, 1988). |

Tabela 26 – Composição do meio de cultura TBX ágar. BCIG - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-d-glucuronídeo; C – Carbono; S – Enxofre.

| Meio de cultura TBX ágar | |
|--------------------------|---|
| Composto | Função |
| Triptona | Fornece energia (Armstrong <i>et al.</i> , 1966), C (Schultz e Marin, 1991), S (Oxoid, 2013) e nutrientes (Takahashi <i>et al.</i> , 2000). |
| Sais biliares nº3 | Enriquecimento seletivo (Thanassi e Cheng, 1997). |
| BCIG | Substrato cromogénico que permite a melhor identificação de <i>E. coli</i> (Watkins <i>et al.</i> , 1988). |
| Ágar | Agente solidificante (Gardener e Jones, 1983). |

4.4.3. Vantagens e desvantagens

Durante este estudo, comprovou-se que o método Colilert[®] é um método fácil, ou seja, a técnica é muito simples de executar, mesmo para quem não tem prática de laboratório. Ao contrário do método de referência que tem alguns pormenores técnicos cruciais, como aplicar o meio de cultura apenas quando está a uma temperatura suportável para o técnico (se não as células de *E. coli* morrem com a temperatura excessiva). Apesar de já

existir no mercado meios de cultura prontos, basta apenas fundir o meio e incorporar na placa de Petri, com o Colilert® não existe nenhuma preocupação com este facto. Aliás, até permite um menor desperdício de meio de cultura, uma vez que vem em embalagens individualizadas para cada amostra. Enquanto, os meios líquidos são aconselháveis serem fundidos apenas uma vez e pode levar ao desperdício de meio quando não existem amostras suficientes para a quantidade de meio.

O Colilert® mostrou ser rápido. No entanto, se tivermos em conta o tempo de preparação da amostra e o tempo da execução técnica excede sem dúvida 1 minuto. Mas, se estivermos a referir ao tempo de execução propriamente dito da técnica, a informação dada pela IDEXX (tempo inferior a 1 minuto) é corroborada por este estudo (IDEXX, 2002). A IDEXX refere que não é preciso confirmações, uma vez que o método permite apenas o desenvolvimento do microrganismo alvo, sem o aparecimento de falso-positivos nem falso-negativos. Esta ideia foi comprovada pelo nosso estudo. O que foi também comprovado é que o Colilert® consegue detetar apenas 1 microrganismo/g, ao contrário do método de referência que não apresentou contagens nestas amostras.

Porém, o Colilert® não mostrou eliminar a subjetividade da interpretação dos resultados, uma vez que a fluorescência, muitas das vezes, não foi notória mesmo com a criação de um ambiente propício à leitura dos resultados (leitura em uma câmara própria). Existiu, por vezes, a dificuldade de distinguir os poços positivos dos poços negativos. Quando ao método de referência, as colónias características de *E. coli* (azuis) estavam bastantes visíveis e fáceis de contar, sem a existência de qualquer dificuldade. Talvez o treino e o hábito da utilização do método de referência mais do que o método Colilert® tenha pesado neste caso. Provavelmente, com o treino a interpretação dos poços positivos deixará de ser subjetivo e passa a ser uma leitura mais objetiva.

Para alguns laboratórios pode ser vantajoso a redução de tempo de incubação de 24 horas (método de referência) para 18 horas (Colilert®-18), mas para um Laboratório que recebe diariamente uma grande quantidade de alimentos, como é o caso do laboratório onde o trabalho prático foi efetuado, isto pode ser um problema. O ter que esperar até às 16.00 horas, por exemplo, para processar alimentos, para as leituras serem efetuadas às 9.00 horas do dia seguinte, pode tornar-se muito complicada a gestão de tempo. Apesar das *trays* poderem estar até às 20 horas na estufa, mesmo assim não se pode começar a analisar amostras logo de manhã, o que no caso deste Laboratório representaria uma falta de tempo para processar todas as amostras. Existe a solução de colocar as *trays* a refrigerar ao terminar o tempo de incubação, mas quando os laboratórios não têm estufas refrigeradas (automática começam a arrefecer) pode-se estar perante outro problema. No entanto, se estivermos perante a formulação do Colilert® 24 horas, estes problemas de gestão de tempo não se colocam. No que toca aos custos do método pode ser visto na seção 4.4.4.

4.4.4. Análise de Custos

Brezmes *et al.* (2002) afirmaram que diversos autores têm vindo a desenvolver sistemas que fornecem informações dos custos de cada análise laboratorial para facilitar o quotidiano dos laboratórios. Estes custos são calculados tendo em conta: (i) o trabalho e o material utilizado para cada análise; (ii) a mão-de-obra e materiais partilhados por diferentes análises; (iii) a supervisão e gestão (Tantanate e Charuruks, 2007).

Os custos da realização de um ensaio podem ser considerados os gastos financeiros incorridos pelo laboratório para realizar a análise, sendo parte integrante das despesas gerais do laboratório. Este custo é uma construção teórica afetada significativamente pelo método escolhido para a realização da análise. Portanto, o preço de um ensaio pode ser considerado como o valor monetário cobrado pelo laboratório ao cliente. No entanto, não se conhece nenhum sistema de análise de custos aceite por todos os laboratórios (Vancani *et. al.*, 1993).

A análise de custos efetuada para os métodos de referência e rápido teve como objetivo averiguar o método mais acessível economicamente para a enumeração de *E. coli* em alimentos. Posto isto, a análise de custos teve em consideração o material específico utilizado, mão-de-obra e o tempo de execução de cada análise. Não abordou os custos inerentes aos equipamentos utilizados, como a eletricidade, manutenção e calibração. Nem os custos associados às descontaminações de material e à gestão de resíduos produzidos pelos métodos. Nem os custos de preparação de meios de cultura (água de peptona e TBX). Tal não aconteceu, pois o Laboratório onde foi efetuado o trabalho prático do estudo não conseguiu facultar dados concretos destes custos.

Cada método foi dividido em três tarefas: (i) preparação da amostra; (ii) processamento da amostra; (iii) leitura da amostra. Em todas as tarefas atendeu-se aos custos dos consumíveis e meios de cultura, assim como do tempo despendido e o preço da mão-de-obra (supondo de cada hora custa 8,50 €). Os preços dos consumíveis e os meios de cultura foram divulgados pelos fornecedores. Em cada método está contabilizado uma diluição apenas, a suspensão-mãe. Se existir mais diluições os custos de consumíveis e meios de cultura é aumentado.

No Anexo III (Tabela 3A e Tabela 3B) encontra-se mais especificado a análise de custos para cada método. Enquanto, as Tabela 27 e Tabela 28 resumem esta análise, apresentando os valores para cada tarefa do (s): (i) consumíveis; (ii) meio de cultura; (iii) tempo/mão-de-obra despendidos. Ainda acrescenta o custo de cada tarefa e o custo total da análise, sem estarem acrescidos de IVA.

Tabela 27 - Custos da análise efetuada pelo método de referência de enumeração de *E. coli*.

| | Tarefa 1: Preparação da amostra custo (€) | Tarefa 2: Processamento da amostra custo (€) | Tarefa 3: Leitura da amostra custo (€) | Custo total da análise (€) |
|---|--|---|---|---------------------------------------|
| Consumíveis | 0,31 | 0,08 | ----- | 0,39 |
| Meio de cultura | 0,05 | 0,03 | ----- | 0,08 |
| Tempo (min)/Mão-de- obra | 0,43 | 0,57 | 0,43 | 1,43 |
| Custo total da análise (€) | 0,79 | 0,68 | 0,43 | 1,89 |

Tabela 28 - Custos da análise efetuada pelo método rápido de enumeração de *E. coli*, o Colilert®-18.

| | Tarefa 1: Preparação da amostra custo (€) | Tarefa 2: Processamento da amostra custo (€) | Tarefa 3: Leitura da amostra custo (€) | Custo total da análise (€) |
|---|--|---|---|---------------------------------------|
| Consumíveis | 0,31 | 1,54 | ----- | 1,85 |
| Meio de cultura | 0,05 | 5,75 | ----- | 5,80 |
| Tempo (min)/Mão-de- obra | 0,43 | 0,71 | 0,43 | 1,57 |
| Custo total da análise (€) | 0,79 | 8,00 | 0,43 | 9,22 |

Após a análise das tabelas, verificou-se que o método de referência é o menos dispendioso para os laboratórios, obtendo um custo total de 1,89 € em comparação com 9,22 € do método Colilert®. No entanto, a IDEXX contrapõe dando o Colilert® como o método mais acessível comparado com os métodos tradicionais de enumeração de *E. coli* em águas (IDEXX, 2004). Porém neste estudo, o Colilert® foi adaptado para enumerar *E. coli* em alimentos, não estando em análise a enumeração de *E. coli* em águas.

A técnica Colilert® foi concebida como opção aos métodos clássicos morosos e caros de enumeração de *E. coli* em águas (Eckner, 1998). Tal como estes métodos, os métodos para enumeração de *E. coli* em alimentos são pouco rápidos, devido à preparação de meios de cultura, diluições em serie e a contagem de colónias. Mas, também empregam muita mão-de-obra e custos acrescidos com o consumo de grandes quantidades de consumíveis (García-Armesto *et al.*, 1993; Sieuwerts *et al.*, 2008).

Talvez perante os métodos de análise de águas o custo da análise de Colilert® seja muito mais acessível para o cliente, logo menos caro para o laboratório. Mas, ao analisar os custos verificou-se que, o Colilert® e o método de referência na análise a alimentos não

estão em concordância com o mencionado para a análise de águas pela IDEXX. Por ventura, o Colilert® ao ter sido fabricado para a análise de águas e a sua adaptação para a análise a alimentos pode ter contribuído para o tornar no método mais dispendioso. Tal, não se veio a comprovar, pois a única adaptação á metodologia Colilert® em alimentos residiu na introdução de uma etapa, a preparação da amostra. Porque, de acordo com as normas nacionais e internacionais, tem que existir a preparação da amostra com a adição de um diluente primário na análise de alimentos. E só depois a amostra é devidamente processada (NP 1829, 1989; ISO 6887-1, 1999; ISO 16649-2, 2001). Como neste estudo as matrizes são alimentos, procedeu-se à preparação da amostra (tarefa 1) antes de iniciar qualquer um dos métodos (método de referência e o método rápido). Em ambos os métodos os custos inerentes a esta tarefa são iguais (0,79 €), pois é utilizado o mesmo meio de cultura (água de peptona), na mesma quantidade (225 mL), os mesmos consumíveis (BagFilter e lâmina de bisturi) e o mesmo tempo de realização (3 minutos).

No processamento da amostra (tarefa 2), a concordância de valores totais não se verificou. Segundo a ISO 16649 – 2 (2001), para se processar uma amostra, uma porção de 1 mL é inoculada em 15 mL do meio de cultura TBX (0,07 €). Por outro lado, a IDEXX disponibiliza uma ampola com o meio de cultura Colilert®-18 (5,75 €) pronto a ser adicionado a 100 mL da amostra a testar (IDEXX, 2002; IDEXX, 2004; IDEXX, 2013a; IDEXX, 2013c). Esta última técnica não utiliza placa de Petri (0,07 €) como meio físico de inoculação, mas o Quanti-Tray® (1,39 €). A diferença dos meios de cultura utilizados e do suporte físico onde ocorre a inoculação conferem uma disparidade notória entre os custos totais dos dois métodos nesta tarefa (a diferença dos métodos é de 4,87 €).

Na leitura de amostras (tarefa 3) o tempo despendido é o mesmo em ambos os métodos, cerca de 3 minutos, perfazendo um total de 0,43 €.

Apesar do método de referência ser caracterizado como trabalhoso, demorado e utilizar grandes volumes de meios de cultura e reagentes. Este método demorou menos tempo e utilizou consumíveis e meios de cultura mais baratos que o método Colilert®. Portanto, o método Colilert® não é um método económico para a enumeração de alimentos. Este facto deve-se ao custo do reagente Colilert® e da placa *tray*, que encarecem o processamento da amostra e posteriormente, o custo final da análise.

Conclusão

Neste estudo conseguiu-se aplicar o método Colilert® á análise de diferentes produtos alimentares, com sucesso. Os produtos que melhor se adaptaram foram: a bola de Berlim, a carne de porco picada crua, a dourada crua; o arroz branco; a sopa caldo-verde; a salada de vegetais crus (alface e cenoura) e o iogurte natural sólido. Os alimentos foram selecionados com base nos seguintes aspetos: (i) amostra distribuída de forma homogénea em todos os poços; (ii) ausência de partículas de alimento nos poços; (iii) poços com cores claras e suaves; (iv) fluorescência perceptível e notória nos poços.

A enumeração de *E. coli* pelo Colilert®-18 foi comparada com o método de referência. O Colilert® mostrou ser um método exato (quando contaminado artificialmente) e não apresentou maiores contagens do que o método de referência, não existindo diferença de resultados entre os dois métodos. Adicionalmente, o Colilert® conseguiu recuperar *E. coli* em *stress* (e naturalmente presente no alimento) com contagens muito baixas, como 1 microrganismo/g, ao contrário do método de referência, que nestes casos não conseguiu detetar *E. coli*.

Por vezes a leitura dos poços foi dificultada, pois a fluorescência não era homogénea ao longo da *tray*. Existiam poços mais brilhantes do que outros. Para além do mais, em todas as amostras de carne de porco picada crua surgiram poços com fluorescência verde, que dificultaram a interpretação dos resultados. No entanto, confirmou-se a presença de *E. coli* nos mesmos.

Contrariando estudos, o Colilert® não apresentou resultados falso-positivos nem falso-negativos. Igualmente, demonstrou ser um método fácil, rápido, mas menos económico que o método de referência.

O presente estudo demonstra assim que o Colilert®-18 pode ser utilizado para enumerar *E. coli* em determinados alimentos.

Perspetivas Futuras

As conclusões do presente estudo carecem de segurança já que se analisou um número bastante reduzido de amostras. Como tal é importante validar o método Colilert® estudando-se um número superior de amostras por tipo de alimento. Igualmente, propõe-se no futuro:

- Proceder ao estudo de falsos-positivos/negativos efetuando-se confirmações diretamente dos poços através de caracterização fenotípica ou até genotípica.
- Após a observação da seletividade estudar mecanismos para a melhorar, se for o caso.
- Os “poços” com carne de porco picada e crua apresentaram pouca fluorescência e/ou fluorescência verde. É importante estudar a possibilidade de anular ou atenuar este efeito pois poderá interferir com a interpretação de resultados.
- Usar o Colilert® noutros alimentos naturalmente contaminados com *E. coli* e observar a recuperação de diferentes situações de *stress*.
- Comparar o Colilert® com outro método de referência em alimentos processados (congelados, desidratados, tratados termicamente, salgados, entre outros) como o NMP, ou seja, métodos reconhecidos por possibilitarem a recuperação de células em *stress*.
- Otimizar as condições de incubação como o binómio tempo/temperatura.

Bibliografia

- 3M Health Care (2001). *Interpretation Guide. Petrifilm™ E.coli/Coliform Count Plate*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 25 de Agosto de 2013, em: http://www.3m.com/intl/kr/microbiology/p_ecoli/use3.pdf.
- 3M Health Care (2008). *Material safety data sheet 3M™ Petrifilm E. coli/Coliform count plates*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 25 de Agosto de 2013, em: http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSuUn_zu8l00xl8_xO8mUNv70k17zHvu9lxtD7SSSSSS--http%3A%2F%2Fmultimedia.3m.com%2Fmws%2Fmediawebserver%3FmwsId%3DSSSSSuUn_zu8l00xl8_xO8mUNv70k17zHvu9lxtD7SSSSSS--.
- 3M Health Care (2013a). *3M™ Petrifilm™ E.coli/Coliform count plates*. Acedido a 25 de Agosto de 2013, no Website: 3M, em: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog/?PC_7_RJH9U523003DC023S7P92O3O87000000_nid=C0WJ62882Vbe29BDXSBJ7Fgl.
- 3M Health Care (2013b). *3M Microbiologia. Placas Petrifilm™*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 25 de Agosto de 2013, em: http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSufSevTsZxtUnYtB58_ZevUgevTSevTSevTSeSSSSSS--&fn=PlacasPetrifilmComp.pdf.
- Abboo, S., Pletschke, B. (2010). Effect of phenolic compounds on the rapid direct enzymatic detection of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase. *African Journal Online*. **36** (1): 133-137. Doi: [org/10.4314/wsa.v36i1.50919](http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v36i1.50919).
- Aertsen, A, Michiels, C. (2004). Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical Reviews in Microbiology*. **30**: 263-273.
- Alonso, J., Amoros, I., Alonso, M. (1996). Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to cefsulodin. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (6): 1885–1888.
- Ambifood e r-biopharm (2010). *Rida Count*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 26 de Agosto de 2013, em: http://www.ambifood.com/img_upload/004amb.pdf.
- Armstrong, J., Adler, J., Dahl, M. (1966). Nonchemotactic mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **93** (1): 390-398.
- AOAC International (2006). *Detection and confirmed quantitation of coliforms and E. coli in foods, SimPlate Coliform and E. coli color indicator*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 1 de Setembro de 2012, em: www.aoac.org/omarev1/2005_03.pdf.
- Argent, V., Booth, N., Flynn, T., Jones, C., Kent, J., Man, B., Reed, R.. (2007). A Pilot UK evaluation of a rapid defined substrate method for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Water and Environmental Journal*. **5** (4): 413-418. Doi: [10.1111/j.1747-6593.1991.tb00638.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-6593.1991.tb00638.x).

- Azad, A., Hafiz, F., Rabman, S. (2003). Fluoregenic assays for rapid detection of *Escherichia coli* in tap water and raw milk samples. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **6** (8): 770-773.
- Bascomb, S. (1987). 3 Enzyme tests in bacterial identification. *Methods in Microbiology*. **19**: 105-160. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70409-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70409-4).
- Berger, S. (2008). Ability of the Colilert method to recover oxidant-stressed *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. **13** (6): 247–250 Doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00620.x.
- Bernasconi, C., Volponi, G., Bonadonna, L. (2006). Comparison of three different media for the detection of *E. coli* and coliforms in water. *Water Science & Technology*. **54** (3): 141-145. Doi: 10.2166/wst.2006.460 .
- Beuchat, L., Copeland, F., Curiale, M., Danisavich, T., Gangar, V., King, B., Lawlis, T., Likin R., Okwusoa, J., Smith C., Townsend D. (1998). Comparison of the SimPlate total plate count method with Petrifilm, Redigel, conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *Journal Food Protection*. **61** (1): 14-18.
- Bidlack, J., Silverman, P. (2004). An active type IV secretion system encoded by the F plasmid sensitizes *Escherichia coli* to bile salts. *Journal of Bacteriology*. **186** (16): 5202-5209.
- BioControl (2010). *SimPlate. Quantitative method for: Total plate count, yeast and mold, coliforms/E. coli, Campylobacter and Enterobacteriaceae*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 26 de Agosto de 2013, em: <http://www.amco-instruments.com/pdf/microbiologia/microbiologia.pdf>.
- BioControl (2012a). *Contagem bacteriológica. Simplate*. Acedido a 26 de Agosto de 2013, no Website: Sovereign and VWR Company, em: <http://sovereign.actcenter.com.br/Products/647-simplate.aspx>.
- BioControl (2012b). *Products, SimPlate-Coliforms/E.coli*. Acedido a 26 de Agosto de 2013, no Website: Sovereign and VWR Company, em: www.biocontrolsystems.com/.
- BioControl (2013). *Simplate - Coliforms*. Acedido a 20 de Fevereiro de 2013, no Website: BioControl, em: <http://www.biocontrolsys.com/products/view/smp>.
- Biokar Diagnostics (2009). *Peptone Water*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 28 de Setembro de 2013, em: [http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/2A44E68DCD57D92EC12574B7004A4088/\\$file/TDS_BK084_v6.pdf](http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/2A44E68DCD57D92EC12574B7004A4088/$file/TDS_BK084_v6.pdf).
- bioMérieux (2007). *Buffered Peptone Water (BPW)*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 28 de Setembro de 2013, em: <http://www.biomerieux-usa.com/upload/Buffered-Peptone-Water-Mini-Package-Insert-2.pdf>.

- bioMérieux (2013). *Videos Tempo, demonstração TEMPO*. Acedido a 10 de Setembro de 2013, no Website: bioMérieux, em: http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?node=Videos_indus.
- BioScience Diagnostics (2012). *Food e Feed. Microbiology*. Acedido a 25 de Agosto de 2013, no Website: BioScience Diagnostics, em: <http://bioscience.com.sg/t1/microbiology.php>.
- Bitton, G., Koopman, B., Jung, K. (1995). An assay for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water and wastewater. *Water Environment Research*. **67** (6): 906-909.
- Blodgett, R. (2005). Serial dilution with a confirmation step. *Food Microbiology*. **22** (6): 547-552. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.017>.
- Blodgett, R. (2008). Mathematical treatment of plates with colony counts outsider the acceptable range. *Food Micorbiology*. **25**: 92-98.
- Boadi, S., Wren, M., Morris-Jones, S. (2010). Selective testing of β -galactosidase activity in the laboratory identification of *Salmonella* and *Shigella* species. *Journal of Clinical Pathology*. **63**: 1101-1104. Doi: 10.1136/jcp.2010.079723.
- Bonadonna, L., Cataldo, C., Semproni, M. (2007). Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination*. **213** (1-3): 18–233. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.601>.
- Brassill, N. (2013). *The assessment of Escherichia coli as an indicator of microbial quality of irrigation waters used for produce*. The University of Arizona. Arizona, EUA.
- Brenner, K., Rankin, C., Roybal, Y., Stelma, G., Dufour, A. (1993). New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Applied and Environmental Microbiology*. **59** (11): 3534-3544.
- Brezmes, M., Ochoa, C., Eiros, J. (2002). Cost analysis in a clinical microbiology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **21** (8): 582-588. Doi: 10.1007/s10096-002-0776-3.
- Brugger, S., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., Muhlemann, K. (2012). Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *Plos One*. **7** (3): 31-36. Doi:10.1371/journal.pone.0033695.
- Buckalew, D., Hartman, L., Grimsley, G., Martin, A.; Register, K. (2006). A long-term study comparing membrane filtration with Colilert defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. *Journal of Environmental Management*. **80**:191-197. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.08.024>.
- Caruso, G., Crisafi, E., Mancuso, M. (2002). Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in seawaters. *Journal of Applied Microbiology*. **93** (4): 548–556.

- Cattani, C., Fuchs, P., Cirolini, A., Vieira, R. (2013). Métodos alternativos para contagem de micro-organismos em carcaças suínas. *Ciência Rural*. **43** (6): 1031-1036. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013005000072>.
- Cattapan, F., Villard, P., Dumont, N. (2007). *A new approach for workflow evaluation in food microbiology laboratories: TEMPO, automated MPN method versus plate count method*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 10 de Junho de 2013, em: <http://www.biomerieux-usa.com/upload/TEMPO%20workflow%20CHELAB-1.pdf>.
- Cerna-Cortes, F., Gómez-Aldapa, C., Rangel-Vargas, E., Ramírez-Cruz, E., Castro-Rosas, J. (2013). Presence of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes on mung bean sprouts from public markets in Pachuca city. *Food Control*. **31**:280-283. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.010>.
- Chao, K., Chao, C., Chao, W. (2003). Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *Journal of Microbiology*. **36** (4):288-93.
- Chao, K., Chao, C., Chao, W. (2004). Evaluation of Colilert-18 for detection of coliforms and *Escherichia coli* in subtropical freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*. **70** (2): 1242-1244.
- Chao, W. (2006). Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. *Letters in Applied Microbiology*. **42** (2): 115-120. Doi: 0.1111/j.1472-765X.2005.01814.x.
- Chung, H., Bang, W., Drake, M. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **5** (3): 52-64. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x.
- Clarke, J., Gilling, M., Altavilla, N., Beattie, A. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*. **46**: 261-267.
- Clavero, M., Beuchat, L. (1995). Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (9): 3268–3273.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingent, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (10): 4555-4558.
- Corkidi, G., Diaz-Uribe, R., Folch-Mallol, J., Nieto-Sotelo, J. (1998). COVASIAM: an image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (4): 1400-1404.
- Coulliette, A. (2008). *Characterization of fecal contamination in the Newport River Estuary (North Carolina, USA)*. Chapel Hill. Ann Arbor, EUA.

- Covert, T., Rice, E., Johnson, S., Berman, D., Johnson, C., Mason, P. (1992). Comparing defined-substrate coliform tests for the detection of *Escherichia coli* in water. *Journal American Water Works Association*. **84**: 98–104.
- Covert, T., Shadix, L., Rice, E., Haines, J., Freyberg, R. (1989). Evaluation of the autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. *Applied and Environmental Microbiology*. **55** (810): 2443-2447.
- Cowburn, J., Goodall, T., Fricker, E., Walter, K., Fricker, C. (1994). A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring. *Letters in Applied Microbiology*. **19**: 50-52. Doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00902.x.
- Dahlen, G., Linde, A. (1973). Screening plate method for detection of bacterial β -glucuronidase. *Applied Microbiology*. **26**: 863-866.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W., Kawaichi, M. (2013). The phylogenetic relationship of Gram-Negative bacteria of Enterobacteriaceae Familiae in the positive widal blood cultures from semarang based on 16S rRNA gene sequences. *The Third Basic Science International Conference*. **31** (2): 142-157.
- Darsanaki, R., Azizzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G., Aliabadi, M. (2013). Biosensors: Functions and Applications. *Journal of Biology and today's world*. **2** (1): 53-61.
- Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. (2001). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. 2ª edição. ASM Press. Washington, EUA.
- Dyer, D. (1970). Microbiological detection and identification system [Versão Eletrônica]. Patent N°. 3,551,295. Califórnia, EUA. Acedido a 3 de Fevereiro de 2013, em: <http://www.google.com/patents/US3551295>.
- Easter, M. (2005). *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*. Interpharm/CRC. Washington, EUA.
- Eccles, J., Searle, R., Holt, D., Dennis, P. (2004). A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology*. **96**: 375–383.
- Eckner, K. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform acteria, *Escherichia coli*, and *Enterococci* used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Swed. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (8): 3079-3083.
- Edberg, S. (1990). Method and medium for use in detecting traget microbes in situ in a specimen sample of a possibly contaminated material. [Versão Eletrônica]. N° da patente: 4925789. Woodland, EUA. Acedido a 27 de Setembro de 2013, em: http://www.lens.org/images/patent/US/4925789/A/US_4925789_A.pdf.

- Edberg, S., Allen, M. (1991). Defined substrate technology method for the rapid and specific enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **74**: 526-529.
- Edberg, S., Edberg, M. (1988). A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. **61**: 389-399.
- Edberg, S.; Allen, M.; Smith, D.; The National Collaborative Study. (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Applied Environmental Microbiology*. **54** (6): 1595-1601.
- Elmund, G., Allen, M., Rice, E. (1999). Comparison of *Escherichia coli*, total coliform, and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. *Water Environment Research*. **71**: 332–339.
- Enrlich, H. (1962). Bacteriology of manganese nodules. I. Bacterial action on manganese in nodule enrichments. *Applied and Environmental Microbiology*. **11** (15): 15-19.
- Escherich, T. (1885). Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medicin*. **3** (16): 547-554.
- Evans, J. (1969). Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: Activation by calcium ion and inhibition by monovalent cation. *Journal of Bacteriology*. **100** (2): 914-922.
- Feng, P., Weagant, S., Grant, M. (2002). *Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Food and Drug Administration. [Versão eletrônica]. 8ª edição. Acedido em 4 de Agosto de 2013, em:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.
- Fiksdal, L., Pommepuy, M., Caprais, M., Midttun, I. (1994). Monitoring fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 1581–1584.
- Fricker, E., DeSarno, M., Warden, P., Eldred, B. (2008). False-negative β -d-glucuronidase reactions in membrane lactose glucuronide agar medium used for the simultaneous detection of coliforms and *Escherichia coli* from water. *Letters in Applied Microbiology*. **47** (6): 539–542. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02453.x.
- Fricker, E., Fricker, C. (1996). Use of two presence/absence systems for the detection of *E. coli* and coliforms from water. *Water Research*. **30** (9): 2226-2228. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00082-6](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(96)00082-6).
- Fricker, E., Illingworth, K., Fricker, C. (1997). Use of two formulations of Colilert and Quantitray™ for assessment of the bacteriological quality of water. *Pergamon*. **31** (10): 2495-2499. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00342-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00342-9).

- Fujiwara, K., Tsuru, D. (1978). New chromogenic and fluorogenic substrates for pyrrolidonyl peptidase. *Journal of Biochemistry*. **83**: 1145-1149.
- Fung, D. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **1** (1): 3-22
- García-Armesto, M., Prieto, M., García-Lopez, M., Otero, A., Moreno, B. (1993). Modern microbiological methods for foods: Colony count and direct count methods. A review. *Microbiología Sociedad Española de Microbiología*. **9**: 1-13.
- Gardener, S., Jones, G. (1983). A New solidifying agent for culture media which liquefies on cooling. *Journal of General Microbiology*. **120**: 731-733.
- Girambagedara, W., Mannapperuma, C. (2010). *Comparison of bacteriological methods for detecting total coliforms and Escherichia coli in water*. University of Peradeniya. Peradeniya, Sri Lanka.
- Giuliodori, A., Gualerzi, C., Soto, S., Vila, J., Tavio, M. (2007). Review on bacterial stress topics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1113**: 95-104.
- Gómez-Aldapa, C., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, R., Villarruel-López, A., Castro-Rosas, J. (2013). Behavior of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, and Enterotoxigenic *E. coli* strains on alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*. **5**: 1308-1479. Doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-060.
- Grasso, G., Sammarco, M., Ripabelli, G., Fanelli, I. (2000). Enumeration of *Escherichia coli* and coliforms in surface water by multiple tube fermentation and membrane filter methods. *Microbios*. 103: 119–125.
- Grossi, M., Lazzarini, R., Lanzoni, M., Pompei, A., Matteuzzi, D., Ricco, B. (2013). A portable sensor with disposable electrodes for water bacterial quality assessment. *Sensors Journal*. **13** (5): 1775–1782. Doi: 10.1109/JSEN.2013.2243142 2013.
- Hallas, G., Giglio, S., Capurso, V., Monis, P., Grooby, W. (2008). Evaluation of chromogenic technologies for use in Australian potable water. *Journal of Applied Microbiology*. **105** (4): 1138-1149 Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03842.x.
- Harrigan, W. (1998). *Laboratory methods in food micorbiology*. 3ª edição. Academic Pres. San Diego, EUA.
- Hayes, P. (1995). *Food microbiology and hygiene*. 2º edição. Chapman e Hall. Londres, Inglaterra.
- Heitzer, A., Kohler, H., Reichert, P., Hamer, G. (1991). Utility of phenomenological models of describing temperature dependence of bacterial growth. *Applied and Environmental Micorbiology*. **57**: 2656-2665.
- Hommel, N., Sayavedra-Soto, L., Arp, D. (2003). Chemolithoorganotrophic growth of nitrosomonas europaea on fructose. *Journal of Bacterology*. **185** (23): 6809-6814.

- Horman, A., Hanninen, M. (2006). Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo-LES, Colilert-18, ReadyCult Coliforms100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Research*. **40** (17): 3249-3256. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.024>.
- Hosokawa, S., Kodaka, H. (2010). Efficacy of Compact Dry Ec for coliform detection in seafood. *Japanese Journal of Food Microbiology*. **27** (2): 80-85.
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A. (2001). *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ free mice against *Salmonella typhimurium* infection. *GUT*. **49** (1): 47-55. Doi:10.1136/gut.49.1.47.
- Hughes, B., Cullum, A., Bennet, A. (2007). Evolutionary adaption to environmental pH in experimental lineages of *Escherichia coli*. *Journal Compilation*. **61** (7): 1725–1734. Doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00139.x.
- Hy Serve (2010a). *Compact Dry, Produtos/Shop*. Acedido a 9 de Fevereiro de 2012, no Website: Hy Serve, em: www.hyserve.com/produto/grupo.php?lang=pt&gr=1.
- Hy Serve (2010b). *Compact Dry Easy test method for counting micro-organisms*. [Versão Eletrónica]. Acedido a 26 de Agosto de 2013, em: http://www.unitechscientific.com/pdf_files/903-001_Compact-Dry-3.pdf.
- ICMSF (2000). *Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración*. 2ª Edição. Editorial ACRIBIA. SA. Zaragoza, Espanha.
- ICMSF (2002). *Microorganisms in Foods*. 7ª Edição. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.
- IDEXX (2002). *Colilert®. Um teste simples de 24 horas para coliformes e E. coli*. [Versão Eletrónica]. Acedido a 10 de Junho de 2013, em http://recife.ifpe.edu.br/recife/Colilert_Portugu_s.pdf.
- IDEXX (2004). *Colilert-18. An easy 18-hour for coliforms and E. coli*. [Versão Eletrónica]. Acedida a 10 de Junho de 2013, em: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Colilert_18_English.pdf.
- IDEXX (2011). *Validação do método Colilert-18/Quanti-Tray para contagem de E. coli e bactérias coliformes em água*. [Versão Eletrónica]. Acedido de 10 de Junho de 2013, em http://www.idexx.co.uk/pdf/en_au/water/7542-01-colilert-18-report-port.pdf.
- IDEXX (2013a). *Colilert-18 Test Kit*. [Versão Eletrónica]. Acedido de 10 de Junho de 2013, em <http://www.idexx.com/resource-library/water/colilert-18-procedure-en.pdf>.
- IDEXX (2013b). *Quanti-Tray/2000. Insert and Most Probable Number (MPN) Table*. [Versão Eletrónica]. Acedido de 10 de Junho de 2013, em <http://www.idexx.com/resource-library/water/quant-tray-2000-procedure-en.pdf>.

- IDEXX (2013c). *Colilert Test Kit*. [Versão Eletrônica]. Acedido de 10 de Junho de 2013, em <http://www.idexx.com/resource-library/water/colilert-procedure-en.pdf>.
- ISO 6887-1 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization. Geneva, Suíça.
- ISO 16649-1 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of B-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony-count technique at 44°C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International Organization for Standardization. Geneva, Suíça.
- ISO 16649-2 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of B-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: Colony-count technique at 44° C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. International Organization for Standardization. Geneva, Suíça.
- ISO 16649-3 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 3: Most probable number technique. International Organization for Standardization. Geneva, Suíça.
- ISO 16140 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. International Organization of Standardization. Geneva, Suíça.
- Jackson, R., Osborne, K., Barnes, G., Jolliff, C., Zamani, D., Roll, B., Stillings, A.; Herzog, D.; Cannon, S.; Loveland, S. (2000). Multiregional evaluation of the SimPlate heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water. *Applied Environmental and Microbiology*. **66** (1): 453-454. Doi: 10.1128/AEM.66.1.453-454.2000.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. **27**: 710-730. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>.
- Jasson, V., Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Debevere, J. (2007). Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 serve method performance testing. *Journal Food Microbiology*. **118**(3):241-249. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.016>.
- Jay, J. (1998). *Modern Food Microbiology*. 5ª Edição. Chapman & Hall Food Science Book. Aspen Publishers, Inc. Maryland, EUA.
- Jay, J. (2000). *Modern Food Microbiology*. 6ª Edição. Aspen Publishers, Inc. Maryland, EUA.

- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7ª Edição. Springer Science and Business Media, Inc. New York, EUA.
- Jorquera, D. (2011). *Comparación entre Métodos Rápido e Clásico para la Evaluación de la Calidad Microbiológica de Moluscos Bivalves*. Universidade do Algarve. Faculdade de Ciências. Faro, Portugal.
- Kämpfer, P., Nienhüser, A., Packroff, G., Wernicke, F., Mehling, A., Nixdorf, K., Fiedler, S., Kolauch, C., Esser, M. (2008). Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **211** (3–4): 374–384. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.021>.
- Kim, J., Ro, E., Yoon, K. (2013). Comparison of growth kinetics of various pathogenic *E. coli* on fresh perilla leaf. *Foods*. **2** (3): 364-373. Doi:10.3390/foods2030364.
- Kinzelman, J., Singh, A., Ng, C., Pond, K., Bagley, R., Gradus, S. (2005). Use of IDEXX Colilert-18® and Quanti-Tray/2000 as a rapid and simple enumeration method for the implementation of recreational water monitoring and notification programs. *Lake and Reservoir Management*. **21**(1):73-77. Doi: 10.1080/07438140509354414.
- Kocharunchitt, C. (2012). *Effects of cold temperature and water activity stress on the physiology of Escherichia coli in relation to carcasses*. University of Tasmania. Tasmania, Australia.
- Kodaka, H., Mizuochi, S., Teramura, H., Nirazuka, T. (2006). Comparison of the Compact Dry EC with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in raw meats. Performance-tested method 110402. *Journal of AOAC International*. **89**: 100-114.
- Kodaka, H., Mizuochi, S., Saito, M., Matsuoka, H. (2008). Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *Journal of Applied Microbiology*. **104** (84): 1112–1118. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03627.x.
- Kornacki, J., Johnson, J. (2001). *Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª Edição. F. P. Downes/K. Ito editors. Washington, EUA.
- Koster, W.; Egli, T.; Ashbolt, N.; Botzenhart, K., Burlion, N.; Endo, T.; Grimont, P.; Guillot, E.; Mabilat, C.; Newport, L.; Niemi, M.; Payment, P.; Prescott, A.; Renaud, P.; Rust, A. (2003). *Assessing microbial safety of drinking water. Improving approaches and methods*. IWA Publishing. Londres, Inglaterra.
- Kramer, T., Liu, J. (2002). Enumeration of coliform bacteria in wastewater solids using defined substrate technology. *Water Environment Research*. **74**: 526–530.
- Kuhnert, F., Boerlin, P., Frey, J. (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**: 107-117.

- Kunicka, A. (2007). Evaluation of the TEMPO® SYSTEM: an automated method for food microbiological quality control. *Journal of Biotechnology*. **131**: 69-72.
- Labolytic (2013). *Rida® Count E.coli*. Acedido a 20 de Agosto de 2013, do Website: Labolytic, em: <http://labolytic.no/produkter/mikrobiologi/metode/vekstmedie-skalfilm-disk/ridacount-e.coli>.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. (2002). *Risk profile: shiga toxin-producing Escherichia coli in red meat and meat products*. Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch, Nova Zelândia.
- Lay, C., Lin, C. (2004). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. **20** (3): 275-281.
- LMV (2008). *Serviços, Controlo Alimentar*. Acedido a 3 de Fevereiro de 2012, no Website: LMV-Laboratório de Medicina Veterinária, em: <http://www.lmv.com.pt/conteudo.php?cat=2&cat1=2&cat2=0&cat3=0&idioma=pt>.
- Lopez-Roldan, R., Tussel, P., Cortina, J. (2013). On-line bacteriological detection in water. *Trends in Analytical Chemistry*. **44**: 46-57. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.010>.
- Luster-Teasley, S., Ives, R. (2013). *Case teaching notes for "Farmville Future? CAFOs and Contamination"*. University at Buffalo. Nova Iorque, EUA.
- Luyt, C., Tandlich, R., Mulle, W., Wilhelmi, B. (2012). Microbial monitoring of surface water in South Africa: an overview. *International Journal of Environmental*. **9** (8): 2669-2693. Doi:10.3390/ijerph9082669.
- MacLeod, R. (1965). The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriological Reviews*. **29** (1): 9-23.
- Macy, J., Dunne, E., Angoran-Benie, Y., Kamelan-Tano, Y., Kouadio, L., Djai, K., Luby, S. (2005). Comparison of two methods for evaluating the quality of stored drinking water in Abidjan, Côte d'Ivoire, and review of other comparisons in the literature. *Journal of Water and Health*. **3** (3): 221-228. Doi: 10.2166/wh.2005.042.
- Maddocks, J., Greenan, M. J. (1975). A rapid method for identifying bacterial enzymes. *Journal of Clinical Pathology*. **28** (8): 686-687.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (1996). *Brock biology of microorganisms*. 8ª Edição. Prentice Hall International. Burgin, EUA.
- Manafi, M. (1996). Fluoregenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology*. **31** (1-3): 45-58. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00963-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00963-4).
- Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*. **60**: 205-218. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3).

- Manafi, M., Kneifel, W., Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological Reviews*. **55** (3): 335-348.
- Mara, D., Horan, N. (2003). *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press. California, EUA.
- Martin, E. (2013). *Bacterial source tracking in impaired watersheds: evaluation of culture-dependent and -independent methods for increased source specificity and improved management*. Texas A&M University. Texas, EUA.
- Martínez-Gómez, K., Flores, M., Castañeda, H., Martínez-Batallar, G., Chávez, G., Ramirez, O., Gosset, G., Encarnación, S., Bolivar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*. **11** (46): 1-21. Doi: 10.1186/1475-2859-11-46.
- McCrary, M. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *Journal of Infectious Diseases*. **17** (1): 183-212.
- McFeters, G., Pyle, B., Gillis, S., Acomb, J., Ferrazza, D. (1992). Chlorine injury and the comparative performance of Colisure™, Colilert™, and ColiQuick™ for the enumeration of coliform bacteria and *E. coli* in drinking water. *Water Science and Technology*. **27**: 261-265.
- Mehdipour, S., Doosti, A., Dehkordi, P. (2012). Detection of cytolethal distending toxin (cdt) and cytotoxic necrotizing factor (cnf) genes among isolates from Iranian sheep carcasses. *Comparative Clinical Pathology*. **21** (6): 1683-1688. Doi: 10.1007/s00580-011-1349-6.
- Muirhead, R., Littlejohn, R., Bremer, P. (2004). Evaluation of the effectiveness of a commercially available defined substrate medium and enumeration system for measuring *Escherichia coli* numbers in faeces and soil samples. *Letters in Applied Microbiology*. **39**: 383-387. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01604.x.
- Murata, M., Fujimoto, H., Nishimura, K., Charoensuk, K., Nagamitsu, H., Raina, S., Kosaka, T., Oshima, T., Ogasawara, N., Yamada, M. (2011). Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. **6** (6): e20063. Doi:10.1371/journal.pone.0020063.
- Ndlovu, T. (2013). *Comparison of diagnostics tools and molecular based techniques for the rapid identification of Escherichia coli and coliforms in contaminated river water*. Cape Peninsula University of Technology. Cape Town, EUA.
- Nelson, D., Kennedy, W. (1972). Transport of Magnesium by a Repressible and a nonrepressible system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **69** (5): 1091-1093.
- Niemela, S., Lee, J., Fricker, C. (2003). A comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli*

- in water with a defined substrate procedure. *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 1285-1292. Doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02099.x.
- Nissui Pharmaceutical (2013). *Compact Dry "Nissui"*. [Versão Eletrónica]. Acedido a 25 de Agosto de 2013, em:
<http://www.ales.com.tr/images/resim/924375978CompactDry.pdf>.
- Noble, R., Weisberg, S. (2005). A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. *Journal of Water and Health*. **3** (4): 381-392. Doi: 10.2166/wh.2005.051.
- NP 1829 (1982). Microbiologia alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica. 1ª Edição. Instituto Português da Qualidade. Lisboa, Portugal.
- Odonkor, S., Ampofo, J. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*. **4** (2): 5-11. Doi: 10.4081/mr.2013.e2.
- Okhuysen, P., DuPont, H. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *The Journal of Infectious Diseases*. **202** (4): 503–505. Doi: 10.1086/654895.
- Okoko, A., Muia, A., Moturi, W., Oyake, M. (2012). Levels of *E. coli* contamination of River Awach and household water in western Kenya. *Journal of Environmental Science and Water Resources*. **1** (5): 120-126 .
- Oliveira, C. (2011). *Correlação entre a presença de Escherichia coli e Salmonella spp. em amostras de produtos alimentares*. Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém. Santarém, Portugal.
- Oliveira, K., Gomes, F., Benko, G., Pimenta, R., Magalhães, P., Mendes, E., Morais, P. (2012). Antimicrobial resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bathing waters of the Lajeado reservoir in Tocantins, Brazil. *Journal of Applied Science*. **7** (2): 30-41 Doi: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.756> 2012.
- Oxoid (2013). *Dehydrated culture media. Peptone water*. Acedido a 28 de Setembro de 2013, no Website: Thermo Scientific, em:
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0009&cat=&sec=1.
- Palmier, C., Tsai, Y., Lang, A., Sangermano, A. (1993). Evaluation of Colilert-Marine water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 786-790.

- Perry, J., Freydiere, A. (2007). The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal Applied Microbiology*. **103** (6): 2046-2055. Doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x.
- Perry, J., James, A., Morris, K., Oliver, M., Chilvers, K., Reed, R., Gould, F. (2006). Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in *Escherichia coli* and enterococci. *Journal of Applied Microbiology*. **101** (5): 977-85. Doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03018.x.
- Peterson, C., Mandel, M., Silhavy, T. (2005). *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. *Journal of Bacteriology*. **187** (22): 7549-7553. Doi: 10.1128/JB.187.22.7549-7553.2005.
- Pisciotta, J., Rath, D., Stanek, P., Flanery, D., Harwood, V. (2002). Marine bacteria cause false-positive results in the Colilert-18 rapid identification test for *Escherichia coli* in Florida waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (2): 539-544.
- Pitkänen, T., Paakkari, P., Miettinen, I., Heinonen-Tanski, H., Paulin, L., Hänninen, M. (2007). Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods*. **68** (3): 522–529. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.007>.
- Pokorny, D., Cimerman, A. (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letter*. **16** (4): 363-366.
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. (2013). Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. **4** (1): 30-36. Doi: <http://dx.doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>.
- Razzaq, A., Irgan, M., Mohsin, M., Malik, K. (2013). Molecular diagnostics of foodborne pathogens. *Indian Journal of Applied & Pure Biology*. **2** (2): 69-75.
- r-biopharm (2004). *Microbiology. Rida Count*. [Versão Eletrónica]. Acedido a 26 de Agosto de 2003, em: http://www.shp.hu/hpc/userfiles/r-biopharm/colony_counting.pdf.
- r-biopharm (2010a). *AOAC RI Approval for RIDA@COUNT E. coli/Coliform (R1007)*. Acedido a 26 de Agosto de 2013, do Website: Rapid Microbiology, em: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/338h8.php>.
- r-biopharm (2010b). *Enterobacteria*. Acedido a 26 de Agosto de 2013, do Website: r-biopharm, em: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/microbiology-hygiene/enterobacteria>.
- Regulamento (CE) nº 2073 (2005). Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Comissão das Comunidades Europeias. Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) nº 1441 (2007). Altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios micribiólogicos aplicáveis a géneros alimentícios. Comissão das Comunidades Europeias. Jornal Oficial da União Europeia.

- Reid, G., Howard, J., Gan, B. S. (2001). Can bacterial interference prevent infection? *Trends in Microbiology*. **9** (9): 424-428.
- Rendón, M., Saldaña, Z., Erdem, A., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J., Puente, J., Girón, J. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104** (25): 10637-10642.
- Rice, E., Allen, M., Edberg, S. (1990). Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by defined-substrate technology. *Applied and Environmental Microbiology*. **56** (5): 1203-1205.
- Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., Roubin, M., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of *E. coli* forms in drinking water: Current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. **49**: 31-54.
- Santarella-Mellwig, R., Pruggnaller, S., Roos, N., Mattaj, I., Devos, D. P. (2013). Three-dimensional reconstruction of bacteria with a complex endomembrane system. *PLOS Biology*. **11** (5): e1001565. Doi:10.1371/journal.pbio.1001565.
- Schets, F., Nobel, P., Strating, S., Mooijman, K., Engels, G., Brouwer, A. (2002). EU drinking water directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. *Letters in Applied Microbiology*. **34**: 227-231.
- Schultz, J., Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. **218** (1): 129-40.
- Sercu, B., Van De Werfhorst, L., Murray, J., Holden, P. (2010). Cultivation-independent analysis of bacteria in IDEXX Quanti-Tray/2000 fecal indicator assays. *Applied and Environmental Microbiology*. **77** (2): 627-633 Doi:10.1128/AEM.01113-10.
- Shadix, L., Rice, E. (1991). Evaluation of β -glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology*. **37**: 908-911.
- Shash, S., Kamel, M., Al-Wasify, R., Samhan, F. (2010). Rapid detection and enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in River Nile using membrane filtration technique. *Environmental Biotechnology*. **6** (1): 6-10.
- Shehata, T., Marr, A. (1971). Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **107** (1): 210-216.
- Shipe, E., Fields, A. (1956). Chelation as a method for maintaining the coliform index in water samples. *Public Health Reports*. **71** (10): 974-978.
- Shulman, S., Friedman, H., Sims, R. (2007). Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clinical Infectious Disease*. **45**: 1025-1029. Doi:10.1086/521946.

- Sieuwerts, S., Bok, F., Mols, E., Vos, W., Van Hylckama, J. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Applied Microbiology*. **47**: 275–278. Doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x.
- Silva, M. (2002). *Avaliação da qualidade microrbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate*. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Sohier, D., Rannou, M., Gorse, F. (2007). *TEMPO® system: AFNOR validation according to the ISO 16140 standard*. [Versão Eletrônica]. Acedido a 10 de Junho de 2013, em:<http://www.biomerieux-usa.com/upload/ISO%2016140%20validation%20by%20AFNOR%20on%20TVC,%20TC%20and%20EC,%20Adria-2.pdf>.
- Solo-Gabriele, H., Wolfert, M., Desmarais, T., Palmer, C. (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied Environmental Microbiology*. **66**: 230–237.
- Sondia, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. **275**: 177–182. Doi: dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- Sousa, O., Evangelista-Barreto, N., Catter, K., Fonteles-Filho, A., Macrae, A., Vieira, R. (2010). Specificity of a defined substrate method used to monitor balneability of tropical coastal waters impacted by polluted stormwater. *Journal of Water and Health*. **8** (3): 543-549. Doi:10.2166/wh.2010.132.
- Souza, L. (2013). *Avaliação do sistemas Petrifilm™ na enumeração de microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina*. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- Suardana, W., Sujaya, N., Artama, W. (2012). Aplikasi kandidat pemindai untuk diagnosis gen Shiga like toxin-2 dari *Escherichia coli* O157:H7. *Journal Veteriner*. **13** (4): 434-439.
- Sutton, S. (2010). The most probable number method and its uses in enumeration, qualification and validation. *Journal of Validation Technology*. **16** (3): 35-38.
- Takahashi, C., Lima, K., Fumie, T., Alterthum, F. (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **16** (8-9): 829-834.
- Tantanate, C., Charuruks, N. (2007). Cost analysis in clinical laboratory in Thailand. *Siriraj Medical Journal*. **59** (1): 35-39.
- Thanassi, D., Cheng, L. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **179** (8): 2512-2518.

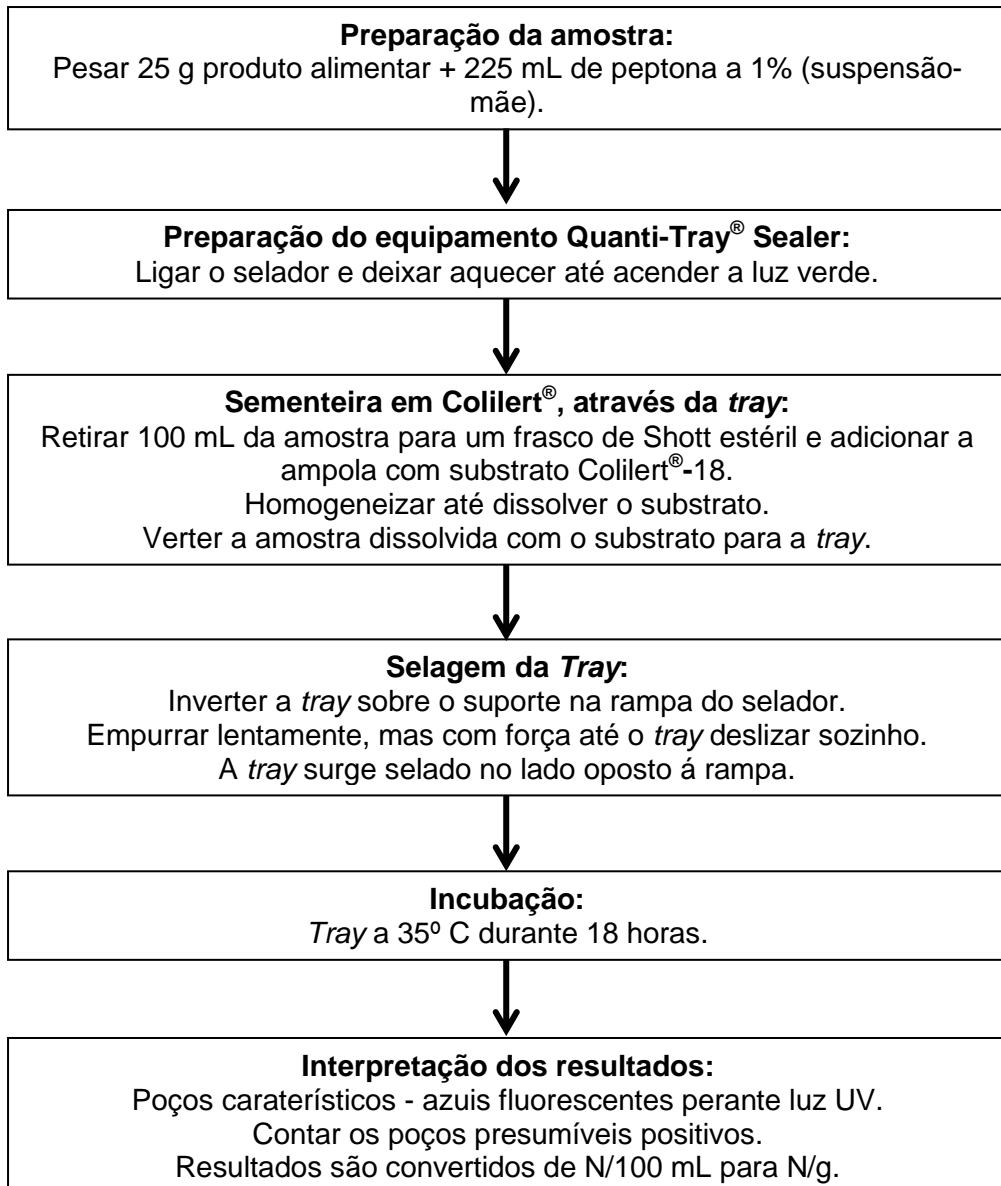
- Ting, C., Jun, A., Shun, Z. (2013). Detection of the common resistance genes in Gram-negative bacteria using gene chip technology. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **31** (2): 142-147.
- Todar, K. (2004). *Nutrition and growth of bacteria*. Acedido a 4 de Agosto 2013, no Web site: Todar's Online Textbook of Bacteriology, em: <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html>.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2001). *Microbiology: An introduction*. San Benjamin Cummings. Francisco, EUA.
- Tortorello, M. (2003). Indicator organisms for safety and quality - uses and methods for detection: minireview. *Journal of AOAC International*. **86** (6): 1208-1217.
- Townsend, D., Irving, R., Naqui, A. (1998). Comparison of the SimPlate Colform and *Escherichia coli* test with Petrifilm, three tube MPN and VRSA+MUG methods for enumerating coliform and *E. coli* in food. *Journal of Food Protection*. **61** (4): 444-449.
- Townsend, D., Naqui, A. (1998). Comparison of SimPlate total plate count with plate count agar method for detection and quantification of bacteria in food. *Journal of AOAC International*. **81** (3): 563-569.
- Trottier, S. (2008). *Study of four new, field-based, micorbiological testa verification of the hydrogen sulfide (H2S), Easygelr, Colilert and Petrifilm™ tests*. Massachusetts Institute of Techonology. Massachusetts, EUA.
- Tryland, I., Fykse, E., Bonno, A., Jantsch, T., Nielson, A., Litved, H. (2010). Monitoring of bacteria in ballast water. *Emerging ballast water management systems*. 219-230.
- Valente, M., Pedro, P., Alonso, M., Borrego, J., Dionísio, L. (2010). Are the defined substrate-based methods adequate to determine the microbiological quality of natural recreational waters? *Journal of Water and Health*. **8** (10): 11-19 .
- Vancani, P., Malek, M., Davey, P. (1993). Cost of gentamicin assays carried out by microbiology laboratories. *Journal Clinical Pathology*. **46**: 890-895.
- Venkateswaran, K., Murakoshi, A., Satake, M. (1996). Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Applied and Environmental Micorbiology*. **62** (7): 2236–2243.
- Vogt, R., Dippold, L. (2005). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. *Public Health Reports*. **120** (2): 174–178.
- Wadouachi, A., Kovensky, J. (2011). Synthesis of glycosides of glucuronic, galacturonic and mannuronic acids: an overview. *Molecules*. **16**: 3933-3968. Doi:10.3390/molecules16053933.
- Warden, P., DeSarno, M., Volk, S., Eldred, B. (2011). Evaluation of Colilert-18® for detection and enumeration of fecal coliform bacteria in wastewater using the U.S.

- Environmental Protection Agency alternative test procedure protocol authors. *Journal of AOAC International*. **94** (5): 1573-1580. Doi: <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-114>.
- Watkins, W., Rippey, S., Clavet, C., Kelley-Reitz, D., Burkhardt III, W. (1988). Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54** (7): 1874-1875.
- Wehr, H., Frank, J. (2004). *Standart methods for examination of dairy products* 11^a edição. American Public Health Association, Inc. New York, EUA.
- Winfield, D., Groisman, E. A. (2003). Minireview. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli* mollie. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (7): 3687–3694. Doi:10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003.
- Wohlsen, T., Bates, J., Robinson, W., Katouli, M. (2006). Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference standards. *Letters in Applied Microbiology*. **42** (4): 350–356. D10.1111/j.1472-765X.2006.01854.
- Wu, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. **25** (6): 735-744. Doi: 10.1016/j.fm.2008.04.011.
- Ximena, A., Alexandra, P. (2008). *Estudio Comparativi en Técnicas de Recuento Rápido en el Mercado y Placas Petrifilm™ 3M™ para el Analisis de Alimentos*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Espanha.
- Yakub, G., Castric, D., Stadterman-Knauer, K. (2002). Evaluation of Colilert and Enterolert defined substrate methodology for wastewater applications. *Water Environment Research*. **74**: 131–135.
- Yoneyama, B., D'Alessio, M. (2013). *Usage of UV disinfection coupled with rain water catchment and stream water in rural areas*. University of Hawaii at Manoa. Havai, EUA.
- Zar, J. (2009). *Biostatistical analysis*. 5^a edição. Prentice Hall. New Jersey, EUA.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Romling, U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the Family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*. **71** (7): 4151–4158.
- Zwietering, M., de Koos, J., de Witt, J., Van't Riet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Micorbiology*. **57**: 1094-1101.

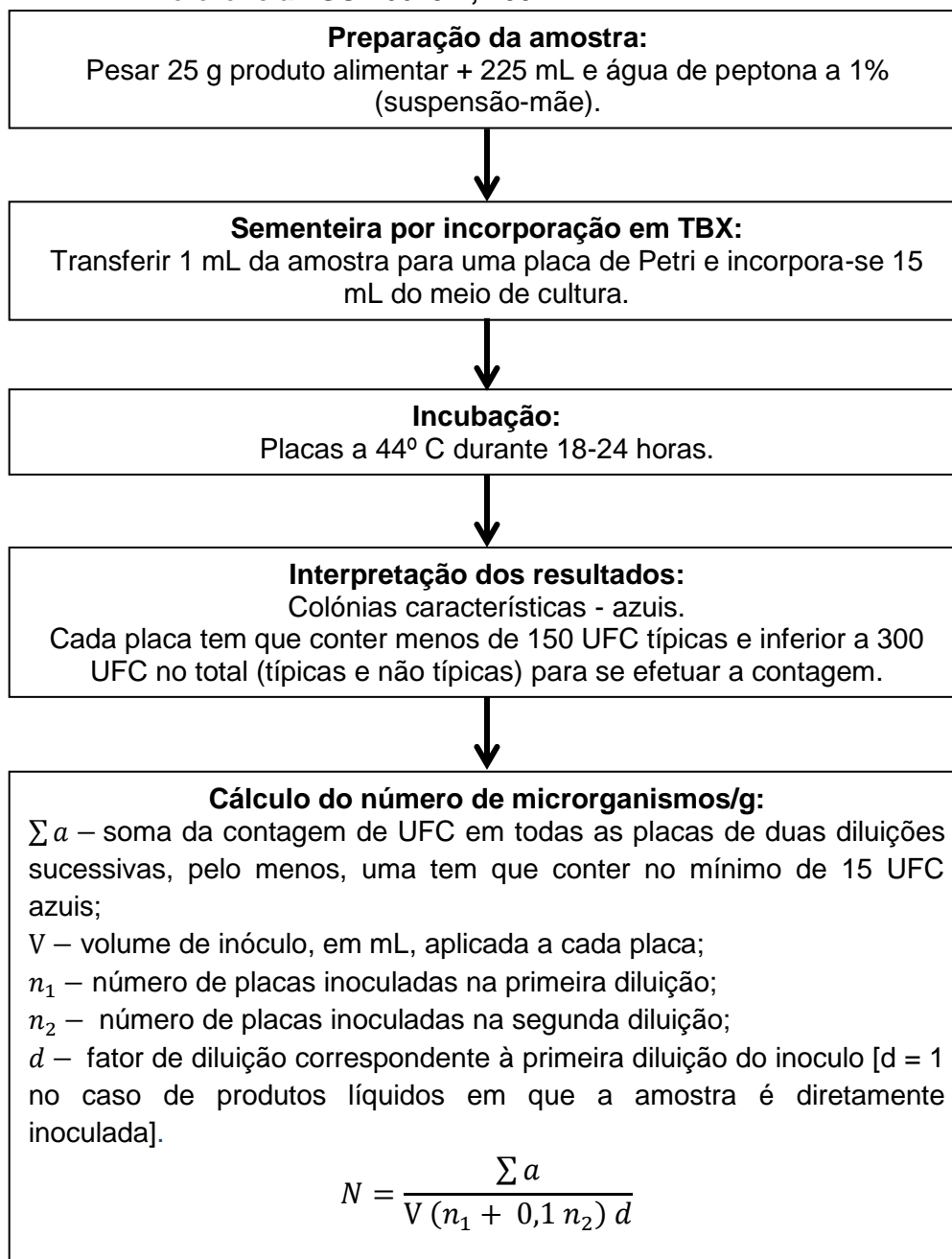
Anexos

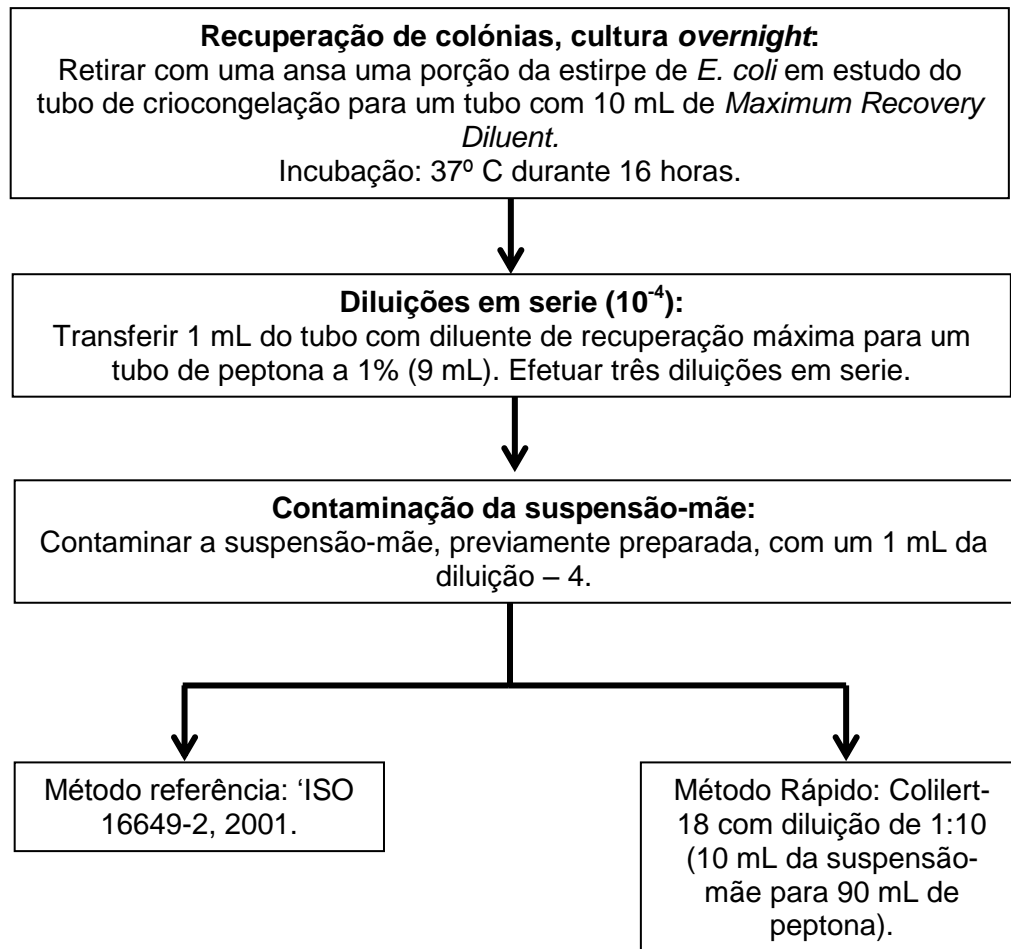
1. Métodos Microbiológicos

1.1. Figura 1A - Preparação da suspensão-mãe e método Colilert®-18

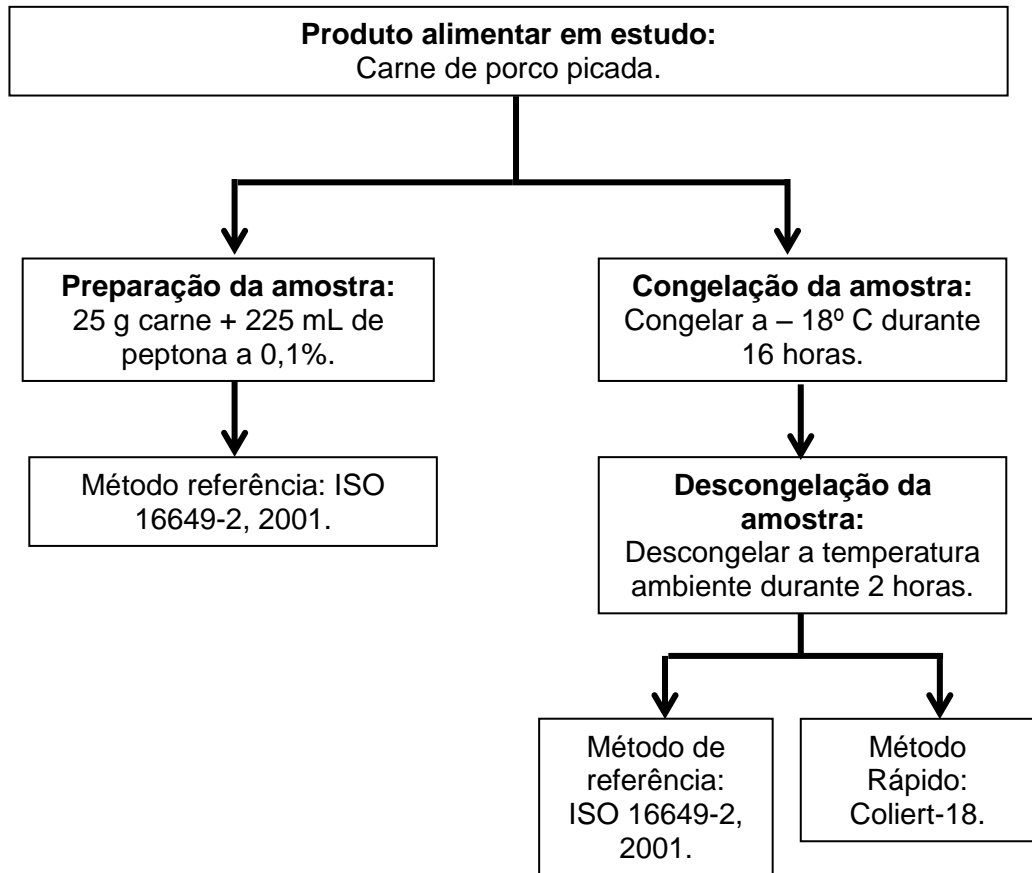


1.2. Figura 1B - Preparação da suspensão-mãe e método de referência: ISO 16649-2, 2001



1.3. Figura 1C - Fase 2: estudo de exatidão do método Colilert®

1.4. **Figura 1D - Fase 3: recuperação de *E. coli* em alimentos congelados**



| # Large Wells Positive | IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | # Small Wells Positive | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 0 | <1 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 9.0 | 10.0 | 11.0 | 12.0 | 13.0 | 14.1 | 15.1 | 16.1 | 17.1 | 18.1 | 19.1 | 20.2 | 21.2 | 22.2 | 23.3 | 24.3 |
| 1 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.1 | 8.1 | 9.1 | 10.1 | 11.1 | 12.1 | 13.2 | 14.2 | 15.2 | 16.2 | 17.3 | 18.3 | 19.3 | 20.4 | 21.4 | 22.4 | 23.5 | 24.5 | 25.6 |
| 2 | 2.0 | 3.0 | 4.1 | 5.1 | 6.1 | 7.1 | 8.1 | 9.2 | 10.2 | 11.2 | 12.2 | 13.3 | 14.3 | 15.4 | 16.4 | 17.4 | 18.5 | 19.5 | 20.6 | 21.6 | 22.7 | 23.7 | 24.8 | 25.8 | 26.9 |
| 3 | 3.1 | 4.1 | 5.1 | 6.1 | 7.2 | 8.2 | 9.2 | 10.3 | 11.3 | 12.4 | 13.4 | 14.5 | 15.5 | 16.5 | 17.6 | 18.6 | 19.7 | 20.8 | 21.8 | 22.9 | 23.9 | 25.0 | 26.1 | 27.1 | 28.2 |
| 4 | 4.1 | 5.2 | 6.2 | 7.2 | 8.3 | 9.3 | 10.4 | 11.4 | 12.5 | 13.5 | 14.6 | 15.6 | 16.7 | 17.8 | 18.8 | 19.9 | 21.0 | 22.0 | 23.1 | 24.2 | 25.3 | 26.3 | 27.4 | 28.5 | 29.6 |
| 5 | 5.2 | 6.3 | 7.3 | 8.4 | 9.4 | 10.5 | 11.5 | 12.6 | 13.7 | 14.7 | 15.8 | 16.9 | 17.9 | 19.0 | 20.1 | 21.2 | 22.2 | 23.3 | 24.4 | 25.5 | 26.6 | 27.7 | 28.8 | 29.9 | 31.0 |
| 6 | 6.3 | 7.4 | 8.4 | 9.5 | 10.6 | 11.6 | 12.7 | 13.8 | 14.9 | 16.0 | 17.0 | 18.1 | 19.2 | 20.3 | 21.4 | 22.5 | 23.6 | 24.7 | 25.8 | 26.9 | 28.0 | 29.1 | 30.2 | 31.3 | 32.4 |
| 7 | 7.5 | 8.5 | 9.6 | 10.7 | 11.8 | 12.8 | 13.9 | 15.0 | 16.1 | 17.2 | 18.3 | 19.4 | 20.5 | 21.6 | 22.7 | 23.8 | 24.9 | 26.0 | 27.1 | 28.3 | 29.4 | 30.5 | 31.6 | 32.8 | 33.9 |
| 8 | 8.6 | 9.7 | 10.8 | 11.9 | 13.0 | 14.1 | 15.2 | 16.3 | 17.4 | 18.5 | 19.6 | 20.7 | 21.8 | 22.9 | 24.1 | 25.2 | 26.3 | 27.4 | 28.6 | 29.7 | 30.8 | 32.0 | 33.1 | 34.3 | 35.4 |
| 9 | 9.8 | 10.9 | 12.0 | 13.1 | 14.2 | 15.3 | 16.4 | 17.6 | 18.7 | 19.8 | 20.9 | 22.0 | 23.2 | 24.3 | 25.4 | 26.6 | 27.7 | 28.9 | 30.0 | 31.2 | 32.3 | 33.5 | 34.6 | 35.8 | 37.0 |
| 10 | 11.0 | 12.1 | 13.2 | 14.4 | 15.5 | 16.6 | 17.7 | 18.9 | 20.0 | 21.1 | 22.3 | 23.4 | 24.6 | 25.7 | 26.9 | 28.0 | 29.2 | 30.3 | 31.5 | 32.7 | 33.8 | 35.0 | 36.2 | 37.4 | 38.6 |
| 11 | 12.2 | 13.4 | 14.5 | 15.6 | 16.8 | 17.9 | 19.1 | 20.2 | 21.4 | 22.5 | 23.7 | 24.8 | 26.0 | 27.2 | 28.3 | 29.5 | 30.7 | 31.9 | 33.0 | 34.2 | 35.4 | 36.6 | 37.8 | 39.0 | 40.2 |
| 12 | 13.5 | 14.6 | 15.8 | 16.9 | 18.1 | 19.3 | 20.4 | 21.6 | 22.8 | 23.9 | 25.1 | 26.3 | 27.5 | 28.6 | 29.8 | 31.0 | 32.2 | 33.4 | 34.6 | 35.8 | 37.0 | 38.2 | 39.5 | 40.7 | 41.9 |
| 13 | 14.8 | 16.0 | 17.1 | 18.3 | 19.5 | 20.6 | 21.8 | 23.0 | 24.2 | 25.4 | 26.6 | 27.8 | 29.0 | 30.2 | 31.4 | 32.6 | 33.8 | 35.0 | 36.2 | 37.5 | 38.7 | 39.9 | 41.2 | 42.4 | 43.6 |
| 14 | 16.1 | 17.3 | 18.5 | 19.7 | 20.9 | 22.1 | 23.3 | 24.5 | 25.7 | 26.9 | 28.1 | 29.3 | 30.5 | 31.7 | 33.0 | 34.2 | 35.4 | 36.7 | 37.9 | 39.1 | 40.4 | 41.6 | 42.9 | 44.2 | 45.4 |
| 15 | 17.5 | 18.7 | 19.9 | 21.1 | 22.3 | 23.5 | 24.7 | 25.9 | 27.2 | 28.4 | 29.6 | 30.9 | 32.1 | 33.3 | 34.6 | 35.8 | 37.1 | 38.4 | 39.6 | 40.9 | 42.2 | 43.4 | 44.7 | 46.0 | 47.3 |
| 16 | 18.9 | 20.1 | 21.3 | 22.6 | 23.8 | 25.0 | 26.2 | 27.5 | 28.7 | 30.0 | 31.2 | 32.5 | 33.7 | 35.0 | 36.3 | 37.5 | 38.8 | 40.1 | 41.4 | 42.7 | 44.0 | 45.3 | 46.6 | 47.9 | 49.2 |
| 17 | 20.3 | 21.6 | 22.8 | 24.1 | 25.3 | 26.6 | 27.8 | 29.1 | 30.3 | 31.6 | 32.9 | 34.1 | 35.4 | 36.7 | 38.0 | 39.3 | 40.6 | 41.9 | 43.2 | 44.5 | 45.9 | 47.2 | 48.5 | 49.8 | 51.2 |
| 18 | 21.8 | 23.1 | 24.3 | 25.6 | 26.9 | 28.1 | 29.4 | 30.7 | 32.0 | 33.3 | 34.6 | 35.9 | 37.2 | 38.5 | 39.8 | 41.1 | 42.4 | 43.8 | 45.1 | 46.5 | 47.8 | 49.2 | 50.5 | 51.9 | 53.2 |
| 19 | 23.3 | 24.6 | 25.9 | 27.2 | 28.5 | 29.8 | 31.1 | 32.4 | 33.7 | 35.0 | 36.3 | 37.6 | 39.0 | 40.3 | 41.6 | 43.0 | 44.3 | 45.7 | 47.1 | 48.4 | 49.8 | 51.2 | 52.6 | 54.0 | 55.4 |
| 20 | 24.9 | 26.2 | 27.5 | 28.8 | 30.1 | 31.5 | 32.8 | 34.1 | 35.4 | 36.8 | 38.1 | 39.5 | 40.8 | 42.2 | 43.6 | 44.9 | 46.3 | 47.7 | 49.1 | 50.5 | 51.9 | 53.3 | 54.7 | 56.1 | 57.6 |
| 21 | 26.5 | 27.9 | 29.2 | 30.5 | 31.8 | 33.2 | 34.5 | 35.9 | 37.3 | 38.6 | 40.0 | 41.4 | 42.8 | 44.1 | 45.5 | 46.9 | 48.4 | 49.8 | 51.2 | 52.6 | 54.1 | 55.5 | 56.9 | 58.4 | 59.9 |
| 22 | 28.2 | 29.5 | 30.9 | 32.3 | 33.6 | 35.0 | 36.4 | 37.7 | 39.1 | 40.5 | 41.9 | 43.3 | 44.8 | 46.2 | 47.6 | 49.0 | 50.5 | 51.9 | 53.4 | 54.8 | 56.3 | 57.8 | 59.3 | 60.8 | 62.3 |
| 23 | 29.9 | 31.3 | 32.7 | 34.1 | 35.5 | 36.8 | 38.3 | 39.7 | 41.1 | 42.5 | 43.9 | 45.4 | 46.8 | 48.3 | 49.7 | 51.2 | 52.7 | 54.2 | 55.6 | 57.1 | 58.6 | 60.2 | 61.7 | 63.2 | 64.7 |
| 24 | 31.7 | 33.1 | 34.5 | 35.9 | 37.3 | 38.8 | 40.2 | 41.7 | 43.1 | 44.6 | 46.0 | 47.5 | 49.0 | 50.5 | 52.0 | 53.5 | 55.0 | 56.5 | 58.0 | 59.5 | 61.1 | 62.6 | 64.2 | 65.8 | 67.3 |
| 25 | 33.6 | 35.0 | 36.4 | 37.9 | 39.3 | 40.8 | 42.2 | 43.7 | 45.2 | 46.7 | 48.2 | 49.7 | 51.2 | 52.7 | 54.3 | 55.8 | 57.3 | 58.9 | 60.5 | 62.0 | 63.6 | 65.2 | 66.8 | 68.4 | 70.0 |
| 26 | 35.5 | 36.9 | 38.4 | 39.9 | 41.4 | 42.8 | 44.3 | 45.9 | 47.4 | 48.9 | 50.4 | 52.0 | 53.5 | 55.1 | 56.7 | 58.2 | 59.8 | 61.4 | 63.0 | 64.7 | 66.3 | 67.9 | 69.6 | 71.2 | 72.9 |
| 27 | 37.4 | 38.9 | 40.4 | 42.0 | 43.5 | 45.0 | 46.5 | 48.1 | 49.6 | 51.2 | 52.8 | 54.4 | 56.0 | 57.6 | 59.2 | 60.8 | 62.4 | 64.1 | 65.7 | 67.4 | 69.1 | 70.8 | 72.5 | 74.2 | 75.9 |
| 28 | 39.5 | 41.0 | 42.6 | 44.1 | 45.7 | 47.3 | 48.8 | 50.4 | 52.0 | 53.6 | 55.2 | 56.9 | 58.5 | 60.2 | 61.8 | 63.5 | 65.2 | 66.9 | 68.6 | 70.3 | 72.0 | 73.7 | 75.5 | 77.3 | 79.0 |
| 29 | 41.7 | 43.2 | 44.8 | 46.4 | 48.0 | 49.6 | 51.2 | 52.8 | 54.5 | 56.1 | 57.8 | 59.5 | 61.2 | 62.9 | 64.6 | 66.3 | 68.0 | 69.8 | 71.5 | 73.3 | 75.1 | 76.9 | 78.7 | 80.5 | 82.4 |
| 30 | 43.9 | 45.5 | 47.1 | 48.7 | 50.4 | 52.0 | 53.7 | 55.4 | 57.1 | 58.8 | 60.5 | 62.2 | 64.0 | 65.7 | 67.5 | 69.3 | 71.0 | 72.9 | 74.7 | 76.5 | 78.3 | 80.2 | 82.1 | 84.0 | 85.9 |
| 31 | 46.2 | 47.9 | 49.5 | 51.2 | 52.9 | 54.6 | 56.3 | 58.1 | 59.8 | 61.6 | 63.3 | 65.1 | 66.9 | 68.7 | 70.5 | 72.4 | 74.2 | 76.1 | 78.0 | 79.9 | 81.8 | 83.7 | 85.7 | 87.6 | 89.6 |
| 32 | 48.7 | 50.4 | 52.1 | 53.8 | 55.6 | 57.3 | 59.1 | 60.9 | 62.7 | 64.5 | 66.3 | 68.2 | 70.0 | 71.9 | 73.8 | 75.7 | 77.6 | 79.5 | 81.5 | 83.5 | 85.4 | 87.5 | 89.5 | 91.5 | 93.6 |
| 33 | 51.2 | 53.0 | 54.8 | 56.5 | 58.3 | 60.2 | 62.0 | 63.8 | 65.7 | 67.6 | 69.5 | 71.4 | 73.3 | 75.2 | 77.2 | 79.2 | 81.2 | 83.2 | 85.2 | 87.3 | 89.3 | 91.4 | 93.6 | 95.7 | 97.8 |
| 34 | 53.9 | 55.7 | 57.6 | 59.4 | 61.3 | 63.1 | 65.0 | 67.0 | 68.9 | 70.8 | 72.8 | 74.8 | 76.8 | 78.8 | 80.8 | 82.9 | 85.0 | 87.1 | 89.2 | 91.4 | 93.5 | 95.7 | 97.9 | 100.2 | 102.4 |
| 35 | 56.8 | 58.6 | 60.5 | 62.4 | 64.4 | 66.3 | 68.3 | 70.3 | 72.3 | 74.3 | 76.3 | 78.4 | 80.5 | 82.6 | 84.7 | 86.9 | 89.1 | 91.3 | 93.5 | 95.7 | 98.0 | 100.3 | 102.6 | 105.0 | 107.3 |
| 36 | 59.8 | 61.7 | 63.7 | 65.7 | 67.7 | 69.7 | 71.7 | 73.8 | 75.9 | 78.0 | 80.1 | 82.3 | 84.5 | 86.7 | 88.9 | 91.2 | 93.5 | 95.8 | 98.1 | 100.5 | 102.9 | 105.3 | 107.7 | 110.2 | 112.7 |
| 37 | 62.9 | 65.0 | 67.0 | 69.1 | 71.2 | 73.3 | 75.4 | 77.6 | 79.8 | 82.0 | 84.2 | 86.5 | 88.8 | 91.1 | 93.4 | 95.8 | 98.2 | 100.6 | 103.1 | 105.6 | 108.1 | 110.7 | 113.3 | 115.9 | 118.6 |
| 38 | 66.3 | 68.4 | 70.6 | 72.7 | 74.9 | 77.1 | 79.4 | 81.6 | 83.9 | 86.2 | 88.6 | 91.0 | 93.4 | 95.8 | 98.3 | 100.8 | 103.4 | 105.9 | 108.6 | 111.2 | 113.9 | 116.6 | 119.4 | 122.2 | 125.0 |
| 39 | 70.0 | 72.2 | 74.4 | 76.7 | 78.9 | 81.3 | 83.6 | 86.0 | 88.4 | 90.9 | 93.4 | 95.9 | 98.4 | 101.0 | 103.6 | 106.3 | 109.0 | 111.8 | 114.6 | 117.4 | 120.3 | 123.2 | 126.1 | 129.2 | 132.2 |
| 40 | 73.8 | 76.2 | 78.5 | 80.9 | 83.3 | 85.7 | 88.2 | 90.8 | 93.3 | 95.9 | 98.5 | 101.2 | 103.9 | 106.7 | 109.5 | 112.4 | 115.3 | 118.2 | 121.2 | 124.3 | 127.4 | 130.5 | 133.7 | 137.0 | 140.3 |
| 41 | 78.0 | 80.5 | 83.0 | 85.5 | 88.0 | 90.6 | 93.3 | 95.9 | 98.7 | 101.4 | 104.3 | 107.1 | 110.0 | 113.0 | 116.0 | 119.1 | 122.2 | 125.4 | 128.7 | 132.0 | 135.4 | 138.8 | 142.3 | 145.9 | 149.5 |
| 42 | 82.6 | 85.2 | 87.8 | 90.5 | 93.2 | 96.0 | 98.8 | 101.7 | 104.6 | 107.6 | 110.6 | 113.7 | 116.9 | 120.1 | 123.4 | 126.7 | 130.1 | 133.6 | 137.2 | 140.8 | 144.5 | 148.3 | 152.2 | 156.1 | 160.2 |
| 43 | 87.6 | 90.4 | 93.2 | 96.0 | 99.0 | 101.9 | 105.0 | 108.1 | 111.2 | 114.5 | 117.8 | 121.1 | 124.6 | 128.1 | 131.7 | 135.4 | 139.1 | 143.0 | 147.0 | 151.0 | 155.2 | 159.4 | 163.8 | 168.2 | 172.8 |
| 44 | 93.1 | 96.1 | 99.1 | 102.2 | 105.4 | 108.6 | 111.9 | 115.3 | 118.7 | 122.3 | 125.9 | 129.6 | 133.4 | 137.4 | 141.4 | 145.5 | 149.7 | 154.1 | 158.5 | 163.1 | 167.9 | 172.7 | 177.7 | 182.9 | 188.2 |
| 45 | 99.3 | 102.5 | 105.8 | 109.2 | 112.6 | 116.2 | 119.8 | 123.6 | 127.4 | 131.4 | 135.4 | 139.6 | 143.9 | 148.3 | 152.9 | 157.6 | 162.4 | 167.4 | 172.6 | 178.0 | 183.5 | 189.2 | 195.1 | 201.2 | 207.5 |
| 46 | 106.3 | 109.8 | 113.4 | 117.2 | 121.0 | 125.0 | 129.1 | 133.3 | 137.6 | 142.1 | 146.7 | 151.5 | 156.5 | 161.6 | 167.0 | 172.5 | 178.2 | 184.2 | 190.4 | 196.8 | 203.5 | 210.5 | 217.8 | 225.4 | 233.3 |
| 47 | 114.3 | 118.3 | 122.4 | 126.6 | 130.9 | 135.4 | 140.1 | 145.0 | 150.0 | 155.3 | 160.7 | 166.4 | 172.3 | 178.5 | 185.0 | 191.8 | 198.9 | 206.4 | 214.2 | 222.4 | 231.0 | 240.0 | 249.5 | 259.5 | 270.0 |
| 48 | 123.9 | 128.4 | 133.1 | 137.9 | 143.0 | 148.3 | 153.9 | 159.7 | 165.8 | 172.2 | 178.9 | 186.0 | 193.5 | 201.4 | 209.8 | 218.7 | 228.2 | 238.2 | 248.9 | 260.3 | 272.3 | 285.1 | 298.7 | 313.0 | 328.2 |
| 49 | 135.5 | 140.8 | 146.4 | 152.3 | 158.5 | 165.0 | 172.0 | 179.3 | 187.2 | 195.6 | 204.6 | 214.3 | 224.7 | 235.9 | 248.1 | 261.3 | 275.5 | 290.9 | 307.6 | 325.5 | 344.8 | 365.4 | 387.3 | 410.6 | 435.2 |

| # Large Wells Positive | IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | # Small Wells Positive | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| 0 | 25.3 | 26.4 | 27.4 | 28.4 | 29.5 | 30.5 | 31.5 | 32.6 | 33.6 | 34.7 | 35.7 | 36.8 | 37.8 | 38.9 | 40.0 | 41.0 | 42.1 | 43.1 | 44.2 | 45.3 | 46.3 | 47.4 | 48.5 | 49.5 |
| 1 | 26.6 | 27.7 | 28.7 | 29.8 | 30.8 | 31.9 | 32.9 | 34.0 | 35.0 | 36.1 | 37.2 | 38.2 | 39.3 | 40.4 | 41.4 | 42.5 | 43.6 | 44.7 | 45.7 | 46.8 | 47.9 | 49.0 | 50.1 | 51.2 |
| 2 | 27.9 | 29.0 | 30.0 | 31.1 | 32.2 | 33.2 | 34.3 | 35.4 | 36.5 | 37.5 | 38.6 | 39.7 | 40.8 | 41.9 | 43.0 | 44.0 | 45.1 | 46.2 | 47.3 | 48.4 | 49.5 | 50.6 | 51.7 | 52.8 |
| 3 | 29.3 | 30.4 | 31.4 | 32.5 | 33.6 | 34.7 | 35.8 | 36.8 | 37.9 | 39.0 | 40.1 | 41.2 | 42.3 | 43.4 | 44.5 | 45.6 | 46.7 | 47.8 | 48.9 | 50.0 | 51.2 | 52.3 | 53.4 | 54.5 |
| 4 | 30.7 | 31.8 | 32.8 | 33.9 | 35.0 | 36.1 | 37.2 | 38.3 | 39.4 | 40.5 | 41.6 | 42.8 | 43.9 | 45.0 | 46.1 | 47.2 | 48.3 | 49.5 | 50.6 | 51.7 | 52.9 | 54.0 | 55.1 | 56.3 |
| 5 | 32.1 | 33.2 | 34.3 | 35.4 | 36.5 | 37.6 | 38.7 | 39.9 | 41.0 | 42.1 | 43.2 | 44.4 | 45.5 | 46.6 | 47.7 | 48.9 | 50.0 | 51.2 | 52.3 | 53.5 | 54.6 | 55.8 | 56.9 | 58.1 |
| 6 | 33.5 | 34.7 | 35.8 | 36.9 | 38.0 | 39.2 | 40.3 | 41.4 | 42.6 | 43.7 | 44.8 | 46.0 | 47.1 | 48.3 | 49.4 | 50.6 | 51.7 | 52.9 | 54.1 | 55.2 | 56.4 | 57.6 | 58.7 | 59.9 |
| 7 | 35.0 | 36.2 | 37.3 | 38.4 | 39.6 | 40.7 | 41.9 | 43.0 | 44.2 | 45.3 | 46.5 | 47.7 | 48.8 | 50.0 | 51.2 | 52.3 | 53.5 | 54.7 | 55.9 | 57.1 | 58.3 | 59.4 | 60.6 | 61.8 |
| 8 | 36.6 | 37.7 | 38.9 | 40.0 | 41.2 | 42.3 | 43.5 | 44.7 | 45.9 | 47.0 | 48.2 | 49.4 | 50.6 | 51.8 | 53.0 | 54.1 | 55.3 | 56.5 | 57.7 | 59.0 | 60.2 | 61.4 | 62.6 | 63.8 |
| 9 | 38.1 | 39.3 | 40.5 | 41.6 | 42.8 | 44.0 | 45.2 | 46.4 | 47.6 | 48.8 | 50.0 | 51.2 | 52.4 | 53.6 | 54.8 | 56.0 | 57.2 | 58.4 | 59.7 | 60.9 | 62.1 | 63.4 | 64.6 | 65.8 |
| 10 | 39.7 | 40.9 | 42.1 | 43.3 | 44.5 | 45.7 | 46.9 | 48.1 | 49.3 | 50.6 | 51.8 | 53.0 | 54.2 | 55.5 | 56.7 | 57.9 | 59.2 | 60.4 | 61.7 | 62.9 | 64.2 | 65.4 | 66.7 | 67.9 |
| 11 | 41.4 | 42.6 | 43.8 | 45.0 | 46.3 | 47.5 | 48.7 | 49.9 | 51.2 | 52.4 | 53.7 | 54.9 | 56.1 | 57.4 | 58.6 | 59.9 | 61.2 | 62.4 | 63.7 | 65.0 | 66.3 | 67.5 | 68.8 | 70.1 |
| 12 | 43.1 | 44.3 | 45.6 | 46.8 | 48.1 | 49.3 | 50.6 | 51.8 | 53.1 | 54.3 | 55.6 | 56.8 | 58.1 | 59.4 | 60.7 | 62.0 | 63.2 | 64.5 | 65.8 | 67.1 | 68.4 | 69.7 | 71.0 | 72.4 |
| 13 | 44.9 | 46.1 | 47.4 | 48.6 | 49.9 | 51.2 | 52.5 | 53.7 | 55.0 | 56.3 | 57.6 | 58.9 | 60.2 | 61.5 | 62.8 | 64.1 | 65.4 | 66.7 | 68.0 | 69.3 | 70.7 | 72.0 | 73.3 | 74.7 |
| 14 | 46.7 | 48.0 | 49.3 | 50.5 | 51.8 | 53.1 | 54.4 | 55.7 | 57.0 | 58.3 | 59.6 | 60.9 | 62.3 | 63.6 | 64.9 | 66.3 | 67.6 | 68.9 | 70.3 | 71.6 | 73.0 | 74.4 | 75.7 | 77.1 |
| 15 | 48.6 | 49.9 | 51.2 | 52.5 | 53.8 | 55.1 | 56.4 | 57.8 | 59.1 | 60.4 | 61.8 | 63.1 | 64.5 | 65.8 | 67.2 | 68.5 | 69.9 | 71.3 | 72.6 | 74.0 | 75.4 | 76.8 | 78.2 | 79.6 |
| 16 | 50.5 | 51.8 | 53.2 | 54.5 | 55.8 | 57.2 | 58.5 | 59.9 | 61.2 | 62.6 | 64.0 | 65.3 | 66.7 | 68.1 | 69.5 | 70.9 | 72.3 | 73.7 | 75.1 | 76.5 | 77.9 | 79.3 | 80.8 | 82.2 |
| 17 | 52.5 | 53.9 | 55.2 | 56.6 | 58.0 | 59.3 | 60.7 | 62.1 | 63.5 | 64.9 | 66.3 | 67.7 | 69.1 | 70.5 | 71.9 | 73.3 | 74.8 | 76.2 | 77.6 | 79.1 | 80.5 | 82.0 | 83.5 | 84.9 |
| 18 | 54.6 | 56.0 | 57.4 | 58.8 | 60.2 | 61.6 | 63.0 | 64.4 | 65.8 | 67.2 | 68.6 | 70.1 | 71.5 | 73.0 | 74.4 | 75.9 | 77.3 | 78.8 | 80.3 | 81.8 | 83.3 | 84.8 | 86.3 | 87.8 |
| 19 | 56.8 | 58.2 | 59.6 | 61.0 | 62.4 | 63.9 | 65.3 | 66.8 | 68.2 | 69.7 | 71.1 | 72.6 | 74.1 | 75.5 | 77.0 | 78.5 | 80.0 | 81.5 | 83.1 | 84.6 | 86.1 | 87.6 | 89.2 | 90.7 |
| 20 | 59.0 | 60.4 | 61.9 | 63.3 | 64.8 | 66.3 | 67.7 | 69.2 | 70.7 | 72.2 | 73.7 | 75.2 | 76.7 | 78.2 | 79.8 | 81.3 | 82.8 | 84.4 | 85.9 | 87.5 | 89.1 | 90.7 | 92.2 | 93.8 |
| 21 | 61.3 | 62.8 | 64.3 | 65.8 | 67.3 | 68.8 | 70.3 | 71.8 | 73.3 | 74.9 | 76.4 | 77.9 | 79.5 | 81.1 | 82.6 | 84.2 | 85.8 | 87.4 | 89.0 | 90.6 | 92.2 | 93.8 | 95.4 | 97.1 |
| 22 | 63.8 | 65.3 | 66.8 | 68.3 | 69.8 | 71.4 | 72.9 | 74.5 | 76.1 | 77.6 | 79.2 | 80.8 | 82.4 | 84.0 | 85.6 | 87.2 | 88.9 | 90.5 | 92.1 | 93.8 | 95.5 | 97.1 | 98.8 | 100.5 |
| 23 | 66.3 | 67.8 | 69.4 | 71.0 | 72.5 | 74.1 | 75.7 | 77.3 | 78.9 | 80.5 | 82.2 | 83.8 | 85.4 | 87.1 | 88.7 | 90.4 | 92.1 | 93.8 | 95.5 | 97.2 | 98.9 | 100.6 | 102.4 | 104.1 |
| 24 | 68.9 | 70.5 | 72.1 | 73.7 | 75.3 | 77.0 | 78.6 | 80.3 | 81.9 | 83.6 | 85.2 | 86.9 | 88.6 | 90.3 | 92.0 | 93.8 | 95.5 | 97.2 | 99.0 | 100.7 | 102.5 | 104.3 | 106.1 | 107.9 |
| 25 | 71.7 | 73.3 | 75.0 | 76.6 | 78.3 | 80.0 | 81.7 | 83.3 | 85.1 | 86.8 | 88.5 | 90.2 | 92.0 | 93.7 | 95.5 | 97.3 | 99.1 | 100.9 | 102.7 | 104.5 | 106.3 | 108.2 | 110.0 | 111.9 |
| 26 | 74.6 | 76.3 | 78.0 | 79.7 | 81.4 | 83.1 | 84.8 | 86.6 | 88.4 | 90.1 | 91.9 | 93.7 | 95.5 | 97.3 | 99.2 | 101.0 | 102.9 | 104.7 | 106.6 | 108.5 | 110.4 | 112.3 | 114.2 | 116.2 |
| 27 | 77.6 | 79.4 | 81.1 | 82.9 | 84.6 | 86.4 | 88.2 | 90.0 | 91.9 | 93.7 | 95.5 | 97.4 | 99.3 | 101.2 | 103.1 | 105.0 | 106.9 | 108.8 | 110.8 | 112.7 | 114.7 | 116.7 | 118.7 | 120.7 |
| 28 | 80.8 | 82.6 | 84.4 | 86.3 | 88.1 | 89.9 | 91.8 | 93.7 | 95.6 | 97.5 | 99.4 | 101.3 | 103.3 | 105.2 | 107.2 | 109.2 | 111.2 | 113.2 | 115.2 | 117.3 | 119.3 | 121.4 | 123.5 | 125.6 |
| 29 | 84.2 | 86.1 | 87.9 | 89.8 | 91.7 | 93.7 | 95.6 | 97.5 | 99.5 | 101.5 | 103.5 | 105.5 | 107.5 | 109.5 | 111.6 | 113.7 | 115.7 | 117.8 | 120.0 | 122.1 | 124.2 | 126.4 | 128.6 | 130.8 |
| 30 | 87.8 | 89.7 | 91.7 | 93.6 | 95.6 | 97.6 | 99.6 | 101.6 | 103.7 | 105.7 | 107.8 | 109.9 | 112.0 | 114.2 | 116.3 | 118.5 | 120.6 | 122.8 | 125.1 | 127.3 | 129.5 | 131.8 | 134.1 | 136.4 |
| 31 | 91.6 | 93.6 | 95.6 | 97.7 | 99.7 | 101.8 | 103.9 | 106.0 | 108.2 | 110.3 | 112.5 | 114.7 | 116.9 | 119.1 | 121.4 | 123.6 | 125.9 | 128.2 | 130.5 | 132.9 | 135.3 | 137.7 | 140.1 | 142.5 |
| 32 | 95.7 | 97.8 | 99.9 | 102.0 | 104.2 | 106.3 | 108.5 | 110.7 | 113.0 | 115.2 | 117.5 | 119.8 | 122.1 | 124.5 | 126.8 | 129.2 | 131.6 | 134.0 | 136.5 | 139.0 | 141.5 | 144.0 | 146.6 | 149.1 |
| 33 | 100.0 | 102.2 | 104.4 | 106.6 | 108.9 | 111.2 | 113.5 | 115.8 | 118.2 | 120.5 | 122.9 | 125.4 | 127.8 | 130.3 | 132.8 | 135.3 | 137.8 | 140.4 | 143.0 | 145.6 | 148.3 | 150.9 | 153.7 | 156.4 |
| 34 | 104.7 | 107.0 | 109.3 | 111.7 | 114.0 | 116.4 | 118.9 | 121.3 | 123.8 | 126.3 | 128.8 | 131.4 | 134.0 | 136.6 | 139.2 | 141.9 | 144.6 | 147.4 | 150.1 | 152.9 | 155.7 | 158.6 | 161.5 | 164.4 |
| 35 | 109.7 | 112.2 | 114.6 | 117.1 | 119.6 | 122.2 | 124.7 | 127.3 | 129.9 | 132.6 | 135.3 | 138.0 | 140.8 | 143.6 | 146.4 | 149.2 | 152.1 | 155.0 | 158.0 | 161.0 | 164.0 | 167.1 | 170.2 | 173.3 |
| 36 | 115.2 | 117.8 | 120.4 | 123.0 | 125.7 | 128.4 | 131.1 | 133.9 | 136.7 | 139.5 | 142.4 | 145.3 | 148.3 | 151.3 | 154.3 | 157.3 | 160.5 | 163.6 | 166.8 | 170.0 | 173.3 | 176.6 | 179.9 | 183.3 |
| 37 | 121.3 | 124.0 | 126.8 | 129.6 | 132.4 | 135.3 | 138.2 | 141.2 | 144.2 | 147.3 | 150.3 | 153.5 | 156.7 | 159.9 | 163.1 | 166.5 | 169.8 | 173.2 | 176.7 | 180.2 | 183.7 | 187.3 | 191.0 | 194.7 |
| 38 | 127.9 | 130.8 | 133.8 | 136.8 | 139.9 | 143.0 | 146.2 | 149.4 | 152.6 | 155.9 | 159.2 | 162.6 | 166.1 | 169.6 | 173.2 | 176.8 | 180.4 | 184.2 | 188.0 | 191.8 | 195.7 | 199.7 | 203.7 | 207.7 |
| 39 | 135.3 | 138.5 | 141.7 | 145.0 | 148.3 | 151.7 | 155.1 | 158.6 | 162.1 | 165.7 | 169.4 | 173.1 | 176.9 | 180.7 | 184.7 | 188.7 | 192.7 | 196.8 | 201.0 | 205.3 | 209.6 | 214.0 | 218.5 | 223.0 |
| 40 | 143.7 | 147.1 | 150.6 | 154.2 | 157.8 | 161.5 | 165.3 | 169.1 | 173.0 | 177.0 | 181.1 | 185.2 | 189.4 | 193.7 | 198.1 | 202.5 | 207.1 | 211.7 | 216.4 | 221.1 | 226.0 | 231.0 | 236.0 | 241.1 |
| 41 | 153.2 | 157.0 | 160.9 | 164.8 | 168.9 | 173.0 | 177.2 | 181.5 | 185.8 | 190.3 | 194.8 | 199.5 | 204.2 | 209.1 | 214.0 | 219.1 | 224.2 | 229.4 | 234.8 | 240.2 | 245.8 | 251.5 | 257.2 | 263.1 |
| 42 | 164.3 | 168.6 | 172.9 | 177.3 | 181.9 | 186.5 | 191.3 | 196.1 | 201.1 | 206.2 | 211.4 | 216.7 | 222.2 | 227.7 | 233.4 | 239.2 | 245.2 | 251.3 | 257.5 | 263.8 | 270.3 | 276.9 | 283.6 | 290.5 |
| 43 | 177.5 | 182.3 | 187.3 | 192.4 | 197.6 | 202.9 | 208.4 | 214.0 | 219.8 | 225.8 | 231.8 | 238.1 | 244.5 | 251.0 | 257.7 | 264.6 | 271.7 | 278.9 | 286.3 | 293.8 | 301.5 | 309.4 | 317.4 | 325.7 |
| 44 | 193.6 | 199.3 | 205.1 | 211.0 | 217.2 | 223.5 | 230.0 | 236.7 | 243.6 | 250.8 | 258.1 | 265.6 | 273.3 | 281.2 | 289.4 | 297.8 | 306.3 | 315.1 | 324.1 | 333.3 | 342.8 | 352.4 | 362.3 | 372.4 |
| 45 | 214.1 | 220.9 | 227.9 | 235.2 | 242.7 | 250.4 | 258.4 | 266.7 | 275.3 | 284.1 | 293.3 | 302.6 | 312.3 | 322.3 | 332.5 | 343.0 | 353.8 | 364.9 | 376.2 | 387.9 | 399.8 | 412.0 | 424.5 | 437.4 |
| 46 | 241.5 | 250.0 | 258.9 | 268.2 | 277.8 | 287.8 | 298.1 | 308.8 | 319.9 | 331.4 | 343.3 | 355.5 | 368.1 | 381.1 | 394.5 | 408.3 | 422.5 | 437.1 | 452.0 | 467.4 | 483.3 | 499.6 | 516.3 | 533.5 |
| 47 | 280.9 | 292.4 | 304.4 | 316.9 | 330.0 | 343.6 | 357.8 | 372.5 | 387.7 | 403.4 | 419.8 | 436.6 | 454.1 | 472.1 | 490.7 | 509.9 | 529.8 | 550.4 | 571.7 | 593.8 | 616.7 | 640.5 | 665.3 | 691.0 |
| 48 | 344.1 | 360.9 | 378.4 | 396.8 | 416.0 | 436.0 | 456.9 | 478.6 | 501.2 | 524.7 | 549.3 | 574.8 | 601.5 | 629.4 | 658.6 | 689.3 | 721.5 | 755.6 | 791.5 | 829.7 | 870.4 | 913.9 | 960.6 | 1011.2 |
| 49 | 461.1 | 488.4 | 517.2 | 547.5 | 579.4 | 613.1 | 648.8 | 686.7 | 727.0 | 770.1 | 816.4 | 866.4 | 920.8 | 980.4 | 1046.2 | 1119.9 | 1203.3 | 1299.7 | 1413.6 | 1553.1 | 1732.9 | 1986.3 | 2419.6 | >2419.6 |

Tabela 3A - Estimativa de custos do método de referência.

| Tarefa 1: Preparação da Amostra | | | | Tarefa 2: Processamento da Amostra | | | | Tarefa 3: Leitura da Amostra | | | | Global (€) |
|---------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------|
| Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | |
| Saco BagFilter | 1 | 0,22 | 0,22 | Placa de Petri | 1 | 0,07 | 0,07 | Tempo (min) | 3 | 0,14 | 0,43 | |
| Água de Peptona a 0,1% | 225 ml | 1,14 | 0,05 | Pontas de 1 ml | 1 | 0,01 | 0,01 | | | | | |
| Lamina Estéril | 1 | 0,09 | 0,09 | Meio de Cultura TBX | 15 ml | 10,31 | 0,03 | | | | | |
| Tempo (min) | 3 | 0,14 | 0,43 | Tempo (min) | 4 | 0,14 | 0,57 | | | | | |
| Sub Total | | | 0,79 | Sub Total | | | 0,68 | Sub Total | | | 0,43 | 1,89 |

Tabela 3B - Estimativa de custos do método Colilert®.

| Tarefa 1: Preparação da Amostra | | | | Tarefa 2: Processamento da Amostra | | | | Tarefa 3: Leitura da Amostra | | | | Global (€) |
|---------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------------------------|------------|--------------------|-----------|------------|
| Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | Descrição | Quantidade | Custo Unitário (€) | Total (€) | |
| Saco BagFilter | 1 | 0,22 | 0,22 | Colilert-18 | 1 | 5,75 | 5,75 | Tempo (min) | 3 | 0,14 | 0,43 | |
| Água de Peptona a 0,1% | 225 ml | 1,14 | 0,05 | Quanti-Tray-2000 | 1 | 1,39 | 1,39 | | | | | |
| Lamina Estéril | 1 | 0,09 | 0,09 | Pipeta Estéril de 25 ml | 1 | 0,15 | 0,15 | | | | | |
| Tempo (min) | 3 | 0,14 | 0,43 | Tempo (min) | 5 | 0,14 | 0,71 | | | | | |
| Sub Total | | | 0,79 | Sub Total | | | 8,00 | Sub Total | | | 0,43 | 9,22 |