

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO - MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Limite mínimo de detecção de métodos de  
análise de *Salmonella* spp. para alimentos:  
uma contribuição metodológica

FERNANDA DE FREITAS VIRGINIO NUNES

Recife  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA DE FREITAS VIRGINIO NUNES

Limite mínimo de detecção de métodos de análise de *Salmonella* spp. para alimentos: uma contribuição metodológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de mestre em nutrição.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Edleide Maria Freitas Pires

Recife  
2006

À minha mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela presença que me fortalece a cada dia.

Às minhas irmãs Cristhiane e Jeanne e meu pai pelo amor, apoio e principalmente compreensão.

À prof<sup>a</sup> Edleide Freitas Pires, pela orientação, ensinamentos, estímulo, carinho e dedicação em toda vida acadêmica.

Aos tios e primos pelo incentivo e carinho.

À Luci, minha eterna babá, por todos os anos de dedicação a minha família.

À Neide Shinohara, pela amizade, apoio, incentivo e prestezas na realização desta dissertação.

À prof<sup>a</sup> Nonete Barbosa Guerra, coordenadora do Laboratório de Análise e Experimentação de Alimentos – LEAAL, pelo incentivo na execução deste trabalho.

Às professoras Tânia Stamford, Janete Magali e Emiko Mendes pela contribuição científica.

Às amigas Karina, Jacira, Tereza e Albânia pelo companheirismo e apoio em todos os momentos durante o mestrado.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do LEAAL, Laércio, Vivaldo e Graciliane pela amizade, profissionalismo e ensinamento desde a época de estagiária.

Aos professores Tânia Stamford, Zelyta Faro, Silvana Salgado, Alda Verônica, Marisilda Ribeiro e Pedro Israel.

À professora Samara Alvachian Andrade pela realização das análises estatísticas.

À minha fiel escudeira Alice Soares pela amizade, dedicação e responsabilidade na execução dos experimentos.

Ao meu primo Leonardo pelas traduções.

Aos amigos Karina, Jacira, Pedro, Raoni, Cristhiane, Jeanne, Eduardo, Fernanda, Keilha, Cidrack, César, Rogério, Geraldo, Kátia, Fernando, Gabriela e Juliana pela companhia nas noites, madrugadas, feriados e finais de semana no laboratório.

Aos meus amigos, especialmente Diana, Drica, Liginha e Nara pelo carinho, incentivo e compreensão da minha ausência em tantos momentos.

À Neci, secretária da Pós-graduação em Nutrição, pela paciência e presteza.

À equipe do LEAAL, Solange, Marcos, Arthur, Camilo, Olívia, Moises, Alexandre, Lourdes e Silvia.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia do LEAAL, Juliane Oliveira, Bruno Lima e Joel Ricardo e pela colaboração.

Ao CNPq pela bolsa de incentivo a pesquisa.

À todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE QUADROS E TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 <i>Salmonella</i> spp.	18
2.2 Aspectos epidemiológicos	16
2.3 Alimentos seguros	20
2.4 Métodos microbiológicos para detecção de <i>Salmonella</i>	21
2.4.1 Método convencional	22
2.4.2 Métodos rápidos/práticos	25
2.5 Limite de detecção	28
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Local da experimentação	37
4.2 Material	37
4.2.1 Ceba	37
4.2.2 Equipamentos	37
4.2.3 Outros materiais	38
4.2.4 Meios de cultura e reagentes	38
4.3 Metodologia	39
4.3.1 Controle de qualidade laboratorial (CQL)	39
4.3.2 Preparação de meios de cultura	40
4.3.3 Cinética microbiana	40
4.3.4 Proposta metodológica para determinação do limite mínimo de detecção (LOD)	42

4.3.5 Métodos utilizados	44
4.3.6 Validação do método LOD	45
4.4 Análise estatística	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
5.1 Validação dos meios de cultura	48
5.2 Cinética microbiana	49
5.3 Limite mínimo de detecção	55
5.4 Validação do método	57
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>69</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Etapas do procedimento para estabelecimento da cinética microbiana	41
<b>Figura 2.</b>	Procedimento para determinação do limite mínimo de detecção para método qualitativo de <i>Salmonella</i> .	44
<b>Figura 3.</b>	<b>Curva de crescimento microbiano para <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</b>	50
<b>Figura 4.</b>	Distribuição dos resíduos obtidos no ajuste dos dados experimentais ao modelo quadrático	52
<b>Figura 5.</b>	Distribuição dos resíduos obtidos no ajuste dos dados experimentais ao modelo de Baranyi	53
<b>Figura 6.</b>	Monitoramento do pH durante a cinética de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 por 24 horas	54

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### QUADRO

<b>Quadro 1.</b>	Controles de pontos críticos utilizados em laboratórios de ensaios microbiológicos.	39
------------------	---	----

### TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Validação dos meios sólidos seletivos e não seletivos com cultura de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	48
<b>Tabela 2.</b>	Validação dos meios líquidos seletivos e não seletivos com cultura de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	48
<b>Tabela 3.</b>	Densidade óptica e contagem de <i>Salmonella typhimurium</i> por 24 horas	49
<b>Tabela 4.</b>	Análise de variância para o ajuste do modelo de Baranyi aos dados obtidos experimentalmente	51
<b>Tabela 5.</b>	Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados obtidos experimentalmente	51
<b>Tabela 6.</b>	Coefficientes de regressão da modelagem do crescimento de microrganismos através da equação quadrática	51
<b>Tabela 7.</b>	Dados obtidos para estabelecimento do LOD	55
<b>Tabela 8.</b>	Resultados positivo/negativo para <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 em diferentes diluições	57
<b>Tabela 9.</b>	Validação do método de LOD	58

## RESUMO

O advento da creditação e a busca para determinar a qualidade dos dados produzidos vêm aumentando a demanda para validação de métodos de controle de qualidade laboratorial. O limite mínimo de detecção (LOD) é a menor concentração de um analito que pode ser mensurada, estabelecendo desta forma o ponto onde a análise é possível. Baseado nisso objetivou-se desenvolver metodologia para estabelecimento do limite mínimo de detecção de métodos de análise de *Salmonella* spp. aplicados a alimentos. Inicialmente foi estabelecida a cinética de uma cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por um período de 24 horas através da contagem de bactérias (UFC/mL) e densidade óptica (absorbância) para observação do desenvolvimento do microrganismo em estudo. Os dados experimentais obtidos foram ajustados matematicamente pelos modelos de Baranyi e quadrático. Com base na curva padrão foi possível determinar o tempo de incubação necessário para o inóculo atingir a fase estacionária. A partir deste, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-11}$  das quais as quatro últimas diluições e branco foram analisadas concomitantemente por métodos AOAC 967.26 (tradicional) e AOAC 996.08 (rápido). O LOD para os métodos testados foi encontrado na faixa de 1 a 8 UFC/25mL de amostra, não apresentando diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ). Quanto à validação do método foi obtida sensibilidade de 100% para ambos os métodos e precisão de 95% para o tradicional e 96,25% para o rápido. Os resultados demonstraram a aplicabilidade dos modelos matemáticos no ajuste da cinética microbiana e a metodologia proposta para limite mínimo de detecção aplicada aos métodos de detecção de *Salmonella* spp. foi satisfatória podendo ser aplicada na rotina laboratorial assegurando maior confiabilidade nos resultados dos ensaios microbiológicos, atendendo as exigências da creditação laboratorial.

## ABSTRACT

The advent of the accreditation and the search to set the quality of the produced data is increasing the demand for validation of methods of quality control. The lower limit of detection (LOD) is the smallest concentration of an analyte that can be measured, setting then the point at which the analysis is just feasible. The purpose of this research was to develop methodology for the establishment of the lower limit of detection applied to methods of analysis of *Salmonella spp* in foods. Initially there was established the kinetics of a culture of *Salmonella typhirium* ATCC 14028 until 24 hours through the microbial numbers (ufc/mL) and the optical density (absorbance) for observation of a microorganism behavior in study. The experimental data obtained were modelled mathematically by the model of Baranyi and quadratic model. Based in the curve of microbial growth it was possible to determinate the necessary incubation time for the culture reach the stationary phase. From them there were performed serial dilutions until  $10^{-11}$  and analyzed the last 4 dilutions and the blank by the methodologies AOAC 967.26 and 996.08, traditional and fast/practical, respectively. The LOD for the tested methods was found in the 1 to 8 UFC/25ml track of the sample, not showing any meaningful difference among them ( $p < 0,05$ ). About the validation of the method there was obtained sensibility of 100% for both and precision of 96,25% for the AOAC 996.08 method and 95% for the AOAC 967.26. It is possible to conclude that the methodology proposed by the lower limit of detection of inserted to the detection methods of *Salmonella spp* was satisfactory being able to use in the laboratory routine focusing to assist the requirements of the laboratory accreditation, as well as to secure greater reliable in the results of the produced microbiological rehearsals.

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A análise microbiológica de um alimento visa investigar a presença ou a ausência de microrganismos no produto, assim como quantificar, identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado, os prováveis riscos à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. Além disso, a análise laboratorial permitirá determinar o agente etiológico mais provável no caso de toxinfecção alimentar. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicas, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidas adequadamente.

Dentre os agentes causais de toxinfecção alimentares, *Salmonella* se destaca pela alta incidência e patogenicidade. Os métodos de investigação laboratorial para este microrganismo em alimentos são criticados pelos analistas por serem laboriosos, além de apresentarem incertezas quanto à sensibilidade, uma vez que as formas de interpretação dos resultados, estabelecidas nas diferentes metodologias, são passíveis de erro.

A escolha da metodologia a ser adotada nas análises microbiológicas de alimentos deve ser norteadas pela precisão pretendida; custo; tempo de análise; aceitabilidade do método por órgãos oficiais e comunidade científica; operacionalidade; treinamento e qualificação do analista; disponibilidade e qualidade de reagentes, meios de cultura e outros suprimentos; disponibilidade de espaço no laboratório, entre outros.

Independente do método selecionado é extremamente importante que cada laboratório desenvolva programas de controle de qualidade com o objetivo de verificar a exatidão e a precisão dos resultados obtidos e garantir que sejam adequados para o que se pretende. No atendimento aos objetivos deve-se ter a segurança de que boas práticas laboratoriais sejam adotadas, impedindo contaminações entre amostras, ambiente e analistas.

Procedimentos de controle de qualidade estabelecidos para análises microbiológicas, quando devidamente implementados na coleta da amostra e nos ensaios, produzirão dados com repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórios proporcionando confiabilidade no julgamento do produto analisado. Os critérios da qualidade devem estar fundamentados nos controles dos pontos críticos amparados por Normas Oficiais, de modo a permitir rastreabilidade dos resultados e suas possíveis interpretações.

Dentre os procedimentos utilizados nos controles dos pontos críticos, os quais estabelecem o limite mínimo de detecção (LOD), são considerados de maior complexidade e

portanto menos aplicados. Ademais, poucas publicações científicas existem até o momento com referências a esse tema, sobretudo para métodos aplicados em alimentos.

A maioria dos analistas concorda que a menor quantidade do analito que pode ser detectada num procedimento e dentro de um limite de confiança é o limite de detecção do método. Quando os limites de confiança são estabelecidos, a probabilidade de erros falso positivo e falso negativo é aceitável.

Considera-se que o desenvolvimento de uma proposta metodológica, a qual facilite a avaliação de limites mínimos de detecção para métodos microbiológicos utilizados convencionalmente em análise de *Salmonella* spp. seja uma importante contribuição para a implantação de controles laboratoriais, bem como para o atendimento às exigências quanto a utilização de procedimentos que assegurem a fidedignidade dos resultados analíticos, incluindo-se dentre estas as da Norma NBR/ISO/IEC 17.025.

# Revisão da literatura

---



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Salmonella* spp.

Considera-se patógeno qualquer microrganismo ou organismo superior capaz de causar doenças (PELCZAR et al., 1997). Os organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos são normalmente divididos em dois grupos: infecciosos (*Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* patogênicas) e intoxicantes (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) (FORSYTHE, 2002).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos (0,7-1,5 x 2-5µm) Gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos e têm como propriedade, a capacidade de fermentar açúcares; utilizar citrato como única fonte de carbono; reduzir nitrato a nitrito; produzir gás durante a fermentação da glicose (exceto *S. typhi*); produzir H<sub>2</sub>S; utilizar lactose e sacarose; desenvolver em presença de KCN; não hidrolisar uréia; fermentar manitol; catalase positiva; oxidase negativa; indol negativo; vermelho de metila positivo; Voges-Proskauer negativa; citrato de Simmons positivo; lisina e ornitina descarboxilase positiva; acetilmetilcarbinol negativo (HOLT et al., 2000; SILVA, 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2004).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, que são os antígenos somáticos (O) de natureza lipopolissacarídica, os flagelares (H) de natureza protéica e os capsulares (Vi). Os antígenos O e Vi são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por 2 horas, e os antígenos H são termolábeis (HOLT et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2004). Um total de 2501 diferentes sorotipos de *Salmonella* foram identificados até 2004 (WHO, 2005).

Existem várias formas de classificação de *Salmonella*. O esquema de classificação proposto por Kauffman divide o gênero em tipos sorológicos em função dos antígenos O, H e Vi. Outro esquema de classificação de *Salmonella*, proposto por Edwards e Ewing reconhece apenas três espécies: *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*. Esta última abriga todas as demais salmonelas, consideradas sorotipos de uma mesma espécie (por exemplo: *Salmonella enteritidis* sorotipo typhimurium). O esquema de Le Minor, por sua vez, considera que o gênero *Salmonella* é formado por apenas uma espécie (*S. enterica*), com sete subespécies (*choleraesuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* e *indica*). Reeves e cols.

propuseram que a subespécie *bongori* fosse também considerada uma espécie de *Salmonella* (HOLT et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Devido à dificuldade de se classificar salmonelas somente pelos antígenos de superfície, outras formas de classificação têm sido propostas e empregadas, as mais importantes são: a biotipagem que está baseada em reações bioquímicas; a fagotipagem baseada na sensibilidade a bacteriófagos específicos e a classificação de acordo com os plasmídios conhecida como perfil plasmidial. Formas alternativas de classificação são indispensáveis nos estudos epidemiológicos (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

O pH próximo a 7,0 e ideal para a multiplicação de *Salmonella*. Valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para a acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5. Não toleram concentrações de sal superiores a 9%. Em relação à umidade disponível, a inibição do crescimento foi observada em valores de atividade de água abaixo de 0,94 em meios com pH neutro. Com atividade de água maiores, os valores de pH podem ser menores. O nitrito é inibitório e seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal para multiplicação é 35-37°C, sendo a mínima 5°C e a máxima 47°C, podendo esses valores variar de acordo com o sorotipo (HOLT et al., 2000; JAY, 2005).

*Salmonella* é uma bactéria entérica patogênica para humanos e muitas espécies de animais, agentes de febre tifóide, febres entéricas, gastroenterites e septicemia. É responsável por graves surtos de intoxicações alimentares em diversos países, inclusive o Brasil, devido ao consumo de alimentos e água contaminados com este microrganismo. (GIOMBELLI, 2000; SILVA Jr, 2002; ALCOCER e OLIVEIRA, 2003).

O habitat primário da *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais de sangue quente e de sangue frio, como pássaros, répteis, animais de granja, homem e ocasionalmente insetos (HOLT et al., 2000; JAY, 2005).

Segundo Silva Jr. (2002), são considerados fontes de *Salmonella* spp., matéria-prima animal (carnes e aves), rações animais (farinha de ossos, farinha de sangue e farinha de peixe), gema de ovo (contaminação transovariana), hortaliças plantadas em ambiente com esterco animal ou humano. A contaminação pode ocorrer de forma cruzada entre a matéria-prima animal (carnes, ovos e aves) e hortaliças contaminadas com alimentos cozidos ou desinfetados; através das mãos, equipamentos, utensílios e bancadas de manipulação; cozimento inadequado de alimentos previamente contaminados; água de poço ou de rede contaminada com esgoto.

Nas salmoneloses, os sintomas aparecem, em média, 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo, durando entre um e quatro dias. De modo geral, salmoneloses não necessitam de tratamento com antibióticos. A antibioticoterapia pode agravar o quadro clínico e prolongar o estado do portador. Nas crianças pequenas e recém-nascidos, a salmonelose pode ser grave já que a *Salmonella* pode atingir a corrente circulatória e provocar lesões em outros órgãos. No adulto, algumas patologias, quando presentes, podem agravar a doença. A salmonelose em um indivíduo com esquistossomose é caracterizada por bacteremia, febre de evolução prolongada, anemia e esplenomegalia. Portadores de vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou com outras deficiências imunológicas podem ter salmoneloses muito graves. Existem relatos de meningites, osteomielites e problemas renais decorrentes de infecções por *Salmonella*. Nestes casos a antibioticoterapia é indispensável (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Considera-se que concentrações elevadas, em torno de  $10^7$  a  $10^9$  são necessárias para que ocorra infecção alimentar e que a concentração patogênica varia com a espécie: *S. bareilly* e *S. newport* em torno de  $10^5$  a  $10^6$  e *S. pullorum*, em torno de  $10^9$  a  $10^{10}$ . No entanto, foi constatada a ocorrência de 3 surtos provocados por *Salmonella* spp. numa concentração de 100 a 15000 células/ 100g de alimento (BRYAN *apud* JAY, 2005).

## 2.2. Aspectos epidemiológicos

Entre os bacilos Gram negativos que produzem gastroenterites de origem alimentar, os mais importantes são os representantes do gênero *Salmonella* (JAY, 2005). A Salmonelose é uma toxinfecção alimentar de alta incidência e de importância em saúde pública com custo significativo para muitos países. Milhões de casos são registrados anualmente em todo o mundo resultando em milhares de mortes. O Center Disease Control (CDC) estima a ocorrência de 2 a 4 milhões de surtos anuais com mais de 2000 subespécies de *Salmonella* (CDC, 2005). Nos Estados Unidos são estimados 1,4 milhões de infecções por *Salmonella* não tifóide, resultando em 168 mil casos, 15 mil internações e 580 mortes, anualmente, com o custo total estimado em 3 bilhões de dólares por ano (WHO, 2005).

Na Inglaterra e países vizinhos, 90% dos surtos são causados por *Salmonella*. Dados publicados nos Estados Unidos, Canadá e Japão indicam que os relatos de ocorrência de salmonelose de origem alimentar aumentam a cada ano (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Altas porcentagens foram observadas por Scuderi et al. *apud* Costalunga e Tondo (2002) na Itália entre 1991 e 1994, quando *Salmonella* spp. foi considerada responsável por 81% dos surtos, onde *S. enteritidis* estava relacionada com 34% deles. Machado e Bernardo *apud* Costalunga e Tondo (2002) também relataram que desde 1984, o mesmo microrganismo foi o que apresentou maior frequência nas causas de salmoneloses humanas em Portugal.

A União Européia registrou em 13 países no período de 1995 a 2001, cerca de 600 mil casos de salmoneloses humana por ano, em sua maioria, causados por *S. enteritidis* e *S. typhimurium* (GILL, REILLY e SMITH, 2002).

Entre 1986 e o primeiro semestre de 1993 foram notificados 150 surtos afetando mais de 6000 pessoas na Argentina, onde 47,3% destes apresentaram *Salmonella enteritidis* como agente causador da toxinfecção (CAFFER e EIGUER, 1994).

De acordo com o Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2004, o Brasil registrou 749 surtos de infecção por Salmonela. Desse total, 277 foram causados especificamente pelo consumo de ovos ou maionese caseira contaminados (BRASIL, 2004).

Várias publicações referem a ocorrências de surtos de toxinfecções alimentares no Brasil. Souza et al. (2000) relatam a contaminação de pães de queijo por microrganismos causadores de toxinfecção, entre estes, *Salmonella* spp. Foi identificado também um surto envolvendo o consumo de sanduíche contaminado por *Salmonella* spp. envolvendo 34 pessoas, com registro de óbito de uma criança (PENA, LEOCÁDIO FILHO e DIAS, 2000).

Aquino, Vasconcelos e Silva (1992) estudando 50 amostras de carne bovina moída, obtidas na condição de consumidor, comercializadas em mercados e açougues na cidade de Manaus-AM, constataram contaminação por *Salmonella* spp. em 14 amostras (28%) procedentes de mercados e 36 (72%) provenientes de açougues.

Avaliando a qualidade da carne moída em feiras livres e supermercados em Campina Grande-PB, Florentino et al. (1997) revelaram a presença de colônias características de *Salmonella* spp. em 100% das 90 amostras analisadas.

Dos 323 surtos investigados ocorridos no Rio Grande do Sul no período de 1997 a 1999, 116 (35,7%) foram causados por *Salmonella* spp. Nestes casos dentre as 8217 pessoas envolvidas, onde 2846 ficaram doentes, 1557 foram hospitalizadas, sem registro de óbito. Alimentos contendo maionese (42,45%) e carnes (16,55%) foram responsáveis por 58,9% dos incidentes (COSTALUNGA e TONDO, 2002).

No ano de 1995 foram notificados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do estado de São Paulo, 56 surtos causados por Salmonela com 3516 casos e 5 óbitos (CVE, 1995). Entre 1999 e 2002, foi notificado, no mesmo centro, 878 surtos de toxinfecção

alimentar, com 20471 casos. Dentre as bactérias envolvidas, o patógeno mais comum foi *Salmonella* spp. com 25,6% dos surtos (EDUARDO, KATSUYA e BASSIT, 2003).

Landgraf e Franco (1996) referem que apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado aos órgãos de inspeção de alimentos, tornando duvidosos os resultados apresentados nas estatísticas brasileiras. Isso se deve ao fato de que muitos patógenos presentes em alimentos causam sintomas brandos e a vítima não busca auxílio médico. Além disso, poucos estados brasileiros possuem serviço de vigilância com competência para organizar os dados epidemiológicos de toxinfecções alimentares. Atualmente, provavelmente menos de 1% dos incidentes são notificados. Dificuldades como o número de inspetores, econômicas e sistemas impróprios de notificação de surtos contribuem para a inadequada organização de dados (COSTALUNGA e TONDO, 2002).

Embora as notificações brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar em nosso país seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de qualidade.

### **2.3. Alimentos seguros**

Analisar amostras alimentícias e ambientais quanto à presença de bactérias patogênicas ou deteriorantes, fungos e toxinas é uma prática para assegurar a qualidade do alimento.

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são, sem dúvida, aqueles que definem as suas características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem julgá-lo quanto às condições de processamento, de armazenamento e de distribuição, sua vida útil e quanto ao risco à saúde da população (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Apesar das infecções alimentares terem sido a principal causa de enfermidades para o homem durante muitos anos, desconhece-se sua incidência real. Há estudos que periodicamente resumem as tendências das enfermidades de origem alimentar. As originadas por patógenos em alimentos constituem um problema mundial de saúde pública que pode ser influenciado pela demografia, industrialização e distribuição de alimentos, transporte,

comercialização, bem como a elucidação e a capacidade de adaptação dos microrganismos. As enfermidades de origem alimentar vão desde gastroenterites leves a enfermidades letais, constituindo perigo à vida do consumidor, podendo deixar seqüelas a longo prazo (ICMSF, 2002).

Em função do risco que a *Salmonella* representa para os consumidores, sua pesquisa em alimentos é de fundamental importância. Os produtores de alimentos, bem como os órgãos de fiscalização têm estado alerta para a necessidade de garantir a ausência de *Salmonella* nos alimentos. Entretanto, essa garantia pode ser limitada, uma vez que as técnicas de laboratório rotineiramente empregadas são trabalhosas e demoradas no fornecimento de resultados (REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002; GIOMBELLI, LOPES DA SILVA, 2002).

#### **2.4. Métodos microbiológicos para detecção de *Salmonella***

A busca por uma metodologia adequada e eficiente para detectar microrganismos em alimentos tem sido constante pelos pesquisadores da área (GIOMBELLI, 2000). Para a utilização adequada de um critério microbiológico é necessário que a metodologia analítica a ser adotada seja selecionada corretamente. Muitos métodos podem ser utilizados para uma mesma determinação, conseqüentemente, a escolha do melhor método dependerá do critério microbiológico adotado e da estrutura do laboratório (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Inúmeros métodos laboratoriais de análises (convencionais e rápidos ou práticos) podem ser utilizados para um mesmo fim e por isso é importante considerar quais os objetivos da análise, uma vez que estes determinam o tipo de análise (um indicador ou um patógeno), o método (rapidez, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, etc), a alíquota analisada (produto final ou da linha de produção), a interpretação do resultado, as ações a adaptar e os reajustes do processo (FRANCO, 1999; ICMSF, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Recentemente, a necessidade de creditação e o conceito de gerenciamento da qualidade total tem resultado em aumento da demanda para validação de métodos de controle de qualidade laboratorial. Entretanto problemas associados com a diversidade da microbiota não desejada, a injúria e estresse do microrganismo, e a influência dos constituintes dos alimentos na produtividade e seletividade dos meios de cultura ainda existem. A influência destes fatores pode ser minimizada se métodos validados para o efetivo controle de qualidade para meios de cultura forem desenvolvidos e experimentados. Cada laboratório pode ser

responsável pelo desenvolvimento de seus próprios protocolos desde que considere esses fatores (CURTIS e BEUCHAT, 1998).

#### **2.4.1. Método convencional**

A detecção de *Salmonella* em alimentos é frequentemente realizada pelo método tradicional também chamado método clássico e foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como é o caso de alimentos com uma microbiota competidora maior do que a população de *Salmonella* e/ou em alimentos nos quais as células de *Salmonella* se encontrem em número muito reduzido e/ou injuriadas por processo de preservação, como a aplicação de calor, de congelamento ou de secagem (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; GIOMBELLI, 2000).

As técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* em alimentos, embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e na forma de preparação das amostras envolvem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação completa das colônias por meio de teste bioquímicos e sorológicos (BAM, 1992; SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; BOER e BEUMER; 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002; GIOMBELLI e LOPES DA SILVA, 2002).

O pré-enriquecimento em caldo não seletivo objetiva a recuperação de células injuriadas por incubação da amostra por um período mínimo de 18 horas a 35-37°C. Vários meios podem ser utilizados nesta etapa, recomendados por órgãos nacionais e internacionais (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; AOAC, 2002; FORTUNA e FRANCO, 2005).

A etapa de enriquecimento em caldo seletivo objetiva inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação do número de *Salmonella* inoculando-se o pré-enriquecido em caldo seletivo por 18-24 horas em temperaturas recomendadas para cada caldo utilizado. Recomenda-se a utilização de no mínimo dois tipos de caldos seletivos, pois a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos destes meios varia de cepa para cepa. A eficácia do isolamento deste microrganismo depende da interação entre meios de enriquecimento seletivo, temperatura e tempo de incubação (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; AOAC, 2002; FORTUNA e FRANCO, 2005).

O plaqueamento seletivo diferencial tem como objetivo promover o desenvolvimento preferencial de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* com características

típicas para posterior confirmação sorológica e bioquímica. Recomenda-se o plaqueamento com no mínimo três diferentes tipos de meios pelas mesmas razões citadas no parágrafo anterior (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; AOAC, 2002; FORTUNA e FRANCO, 2005).

A primeira confirmação (testes preliminares – triagem) é realizada com o objetivo de verificar se as colônias típicas desenvolvidas nas placas são realmente *Salmonella*. Na triagem, as colônias são submetidas aos testes de descarboxilação da lisina, fermentação da lactose e/ou sacarose e produção de H<sub>2</sub>S, em agar lisina ferro (LIA) e agar tríplice açúcar ferro (TSI), permitindo excluir das etapas subsequentes colônias que não são típicas de *Salmonella* (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; AOAC, 2002; FORTUNA e FRANCO, 2005).

A segunda confirmação é efetuada através de provas bioquímica e sorológica utilizadas quando a identificação da espécie de *Salmonella* é necessária. Colônias características de *Salmonella* spp. nesses meios devem ser submetidas ao teste sorológico somático polivalente, para a confirmação. Após as provas bioquímicas (ou durante) confirmar por coloração pelo método de Gram, a presença de bastonetes Gram negativos (FORTUNA e FRANCO, 2005).

O isolamento e a identificação de bactérias desse gênero têm sido estudados em muitos laboratórios, principalmente naqueles envolvidos com a vigilância sanitária de alimentos, uma vez que, a presença destes microrganismos torna o alimento impróprio para o consumo humano, no entanto pesquisadores ainda encontram dificuldades no seu isolamento (SILVA, 2000).

Muitos estudos têm revelado diferenças significativas entre os resultados obtidos com métodos tradicionais, principalmente no que se refere aos meios de cultura e às temperaturas de incubação aplicadas nas etapas de seu procedimento (GIOMBELLI, 2000).

Nascimento et al. (2000), comparando meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados em pesquisa de *Salmonella* em carcaça de frango concluíram que, os caldos enriquecedores Rapaport-novobiocina (RVN), selenito-cistinovanobiocina (SCN) e tetracionato-novobiocina (TN) não apresentaram diferença significativa entre si, no entanto, em valores absolutos, o caldo SCN foi superior aos demais, sendo nítida a diferença em relação aos resultados obtidos com o caldo RVN. Comparando os meios de isolamento em placa agar Hektoen (HE), agar MacConkey (MC), agar *Salmonella*-*Shigella* (SS), agar verde brilhante (VB) e agar xilose lisina desoxilato (XLD) observaram que não houve diferença significativa entre eles, porém, um destaque numérico quanto à eficiência do agar XLD em



relação aos demais, seguido pelo agar HE e agar SS. Constataram também que a associação de um ou mais meios aumentou a eficiência quanto à positividade para *Salmonella*.

Verificando a influencia das temperaturas de pré-enriquecimento (35°C e 42°C) sobre três diferentes caldos de enriquecimento seletivos, Giombelli (2000) constatou que apenas o caldo Tetrionato-Verde Brilhante apresentou um aumento na sua eficiência quando em uma temperatura de 42°C. Os demais caldos, Selenito Cistina e Rappaport-Vassiliadis não apresentaram alterações significativas em relação à temperatura. Quando avaliados em associação com os meios sólidos Rambach e Verde Brilhante, no plaqueamento seletivo observou-se maior eficiência para os caldos Tetrionato-Verde Brilhante seguido por Rappaport-Vassiliadis e a melhor eficiência foi demonstrada pelo caldo Selenito Cistina. Foi constatado, também neste estudo, resultados diferentes com os três caldos testados, demonstrando que mesmo com a utilização de dois caldos de enriquecimento seletivos em análises rotineiras de *Salmonella* spp. podem ser obtidos resultados falsos-negativo.

Huang et al. (1999) observaram que o número de *Salmonella* spp. em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) foi maior quando comparado com o caldo Tetrionato Verde Brilhante (TBG) para enriquecimento seletivo e que a combinação de RV como enriquecimento seletivo com o meio de pós-enriquecimento BHI pode ser usado para isolamento e identificação por método tradicional bem como para ELISA. Além disso, observaram também que o uso de diferentes meios de cultura pode afetar o crescimento de *Salmonella* spp. e o imunoensaio.

Giombelli e Lopes da Silva (2002), concluíram que a temperatura de pré-enriquecimento a 42°C proporcionou maior índice de isolamento de *Salmonella* em amostras de carnes *in natura* comparado à temperatura de 35°C. Observaram também que os caldos Tetrionato e Rappaport-Vassiliadis, em associação com os meios sólidos Rambach e Verde Brilhante, formam uma melhor combinação para serem utilizados em análises de *Salmonella* em ambas as temperaturas de pré-enriquecimento e, que o desempenho do método tradicional aumenta com a utilização de duas temperaturas de pré-enriquecimento (35°C e 42°C), três caldos de enriquecimento seletivo e dois meios sólidos de isolamento.

Segundo Fung *apud* Boer e Beumer (1999), os métodos bacterianos convencionais dependem de meios microbiológicos específicos que permitem isolar e enumerar células bacterianas viáveis nos alimentos. Esses métodos são sensíveis, econômicos e podem dar informações ao mesmo tempo do número e da natureza dos microrganismos presentes na amostra de alimento, porém requerem quatro a cinco dias para confirmação dos resultados uma vez que dependem da habilidade dos microrganismos em multiplicar-se em colônias

visíveis. Além disso, a preparação de meio de cultura, a inoculação em placas, a contagem de colônias e a caracterização bioquímica fazem desses métodos trabalhosos. Portanto, o emprego de métodos rápidos, simples e confiáveis, é importante tanto no diagnóstico de toxinfecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos (ALCOCER e OLIVEIRA, 2003).

Especialmente na indústria de alimentos são necessários métodos mais rápidos para fornecer informações adequadas da possível presença de patógenos em matérias-primas e produtos finais possibilitando a intervenção no controle do processo de fabricação e para o monitoramento das práticas de limpeza e higiene. Esses métodos rápidos detectam e enumeram os microrganismos com prematuridade, e possibilitam a sua caracterização e isolamento para uso microbiológico, químico, imunológico e sorológicos.

#### **2.4.2. Métodos rápidos/práticos**

Nos últimos anos, vários métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. foram propostos e dentre eles destacam-se as técnicas imunológicas. O primeiro ensaio imunoenzimático (EIA) para *Salmonella* spp. foi reportado em 1977 com a necessidade de abreviar o tempo para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial (BEUMER, BRINKMAN e ROMBOOTS, 1991; FRANCO, 1999). Os imunoenaios enzimáticos (EIA) baseados em técnicas de triagem podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção de diversos tipos de patógenos em alimentos (AOAC, 2002) e são muito empregados por apresentarem diversas vantagens: simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem (FRANCO, 1999).

As técnicas imunológicas, baseadas nas reações antígeno-anticorpo empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica facilitados por leitores automatizados sendo utilizado como método de triagem. Inúmeros Enzyme-Liked Immunosorbent Assays – ELISA foram desenvolvidos, usando anticorpos policlonais e monoclonais que são capazes de detectar muitos sorotipos de *Salmonella* spp. associados à infecção humana (BEUMER, BRINKMAN e ROMBOOTS, 1991; FRANCO, 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2001; ALCOCER e OLIVEIRA, 2003).

Os métodos imunológicos contam com a especificidade de ligação do anticorpo com o antígeno. Para detecção de um microrganismo ou toxina microbiana específica, uma variedade de anticorpos são aplicados em diferentes tipos de amostras. A adequação desses

anticorpos depende geralmente de sua especificidade. Anti-soros policlonais contêm uma variedade de anticorpos originários de diferentes células e, portanto, de diferentes especificidades. Muitos anticorpos usados em imunoenaios são derivados do soro de coelho ou carneiro. Uma desvantagem no uso de anti-soro policlonal em imunoenaios é a inconstância da resposta imune do animal. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais aumentou muito o campo dos imunoenaios devido à comprovação consistente e pesquisas confiáveis de caracterização de anticorpos (BOER e BEUMER, 1999).

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos existentes, o tipo não competitivo (tipo sanduíche) é o mais empregado nos sistemas de triagem de microrganismos patogênicos em alimentos. Todos os “kits” de EIA disponíveis para análise de *Salmonella* spp. até o momento são heterogêneos onde os patógenos investigados, se presentes no produto em teste, são capturados por aglutinação através de anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida que dependendo do sistema pode ser esferas de poliestireno, placas de microtitulação, partículas metálicas, papel etc. Na etapa seguinte, o complexo antígeno-anticorpo reage com o conjugado preparado, através da ligação do anticorpo específico para o microrganismo a ser detectado e com uma enzima cromogênica. As enzimas mais utilizadas nesses testes são a fosfatase alcalina, peroxidase e  $\beta$ -galactosidase. Após um período, o conjugado não ligado presente é lavado e uma substância é adicionada. Em seguida, o sanduíche formado reage com o substrato da enzima cromogênica, resultando no desenvolvimento de cor. Substratos fluorogênicos também podem ser empregados e mensurados diretamente pela quantidade de fluorescência. Se a enzima está presente, o substrato será modificado, resultando em um produto que pode ser detectado por técnicas colorimétricas ou fluorométricas (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; BOER e BEUMER, 1999; FRANCO, 1999).

Vários “kits” de ELISA para *Salmonella* spp. estão disponíveis comercialmente, e geralmente requerem que o organismo-alvo esteja em uma concentração de  $10^6$  UFC/mL, apesar de alguns testes relatarem limite de sensibilidade de  $10^4$  (FORSYTHE, 2002). Tal requerimento justificam as etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo empregadas nas metodologias. Três desses “kits” foram validados pela Association of Official Analytical Chemistry (AOAC): *Salmonella*-Tek, TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay e VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* [SLM] Assay. Em comparação com métodos tradicionais, o tempo de ensaio é reduzido em até 2 dias e a análise estatística dos dados indica que não há diferença significativa entre eles. A essas vantagens aliam-se outras como: maior sensibilidade e especificidade, comparadas aos métodos convencionais. O maior problema relatado com os

métodos é a ocorrência de resultados falso-positivo ou falso-negativo. Resultados falso-positivos de ELISA podem ser eliminados usando combinações de anticorpos monoclonais de alta especificidade (BEUMER, BRINKMAN e ROMBOUTS, 1991; FRANCO, 1999; AOAC, 2002).

Os microbiologistas de alimentos podem ainda utilizar o sistema Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS<sup>TM</sup>, BioMérieux). Trata-se de um sistema de análise qualitativa imunoenzimática automatizada que utiliza pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) uma mistura de anticorpos monoclonais de captura com grande especificidade para detecção de antígenos (estirpes/cepas móveis e imóveis) de *Salmonella* nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. Todas as etapas do teste são executadas automaticamente utilizando galerias plásticas descartáveis, constituídas de compartimentos contendo os reagentes necessários para o teste. A leitura e interpretação dos resultados também é automática (BOER e BEUMER, 1999; FRANCO, 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2001; AOAC, 2002).

No VIDAS<sup>TM</sup> o cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem para o teste. O interior do cone está revestido com anticorpos anti-*Salmonella* adsorvidos na sua superfície. Os outros reagentes estão prontos a ser usados e pré-repartidos no barrete. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente pelo aparelho. Uma fração das alíquotas do caldo de enriquecimento aquecido é colocada no barrete e a amostra é submetida a um ciclo de aspiração e dispensação cuja duração foi especificamente calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes no meio vão fixar-se aos anticorpos monoclonais anti-*Salmonella* aderidos ao interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos não fixados. Em seguida, os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e dispensados pelo cone e vão fixar-se aos antígenos de *Salmonella*, que já se encontram fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Na etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise no substrato em um produto (4-metil umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a 450nm (AOAC, 2002).

Em várias pesquisas conduzidas para investigar a possibilidade do emprego da técnica imunoenzimática para detecção de *Salmonella* em alimentos verificou-se que, quando utilizada com culturas puras ou aplicadas em alimentos experimentalmente ou naturalmente contaminados, apresentou alta especificidade e/ou sensibilidade nos vários tipos de alimentos testados (REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2001; DICKER et al., 2005).

Tapchaisri apud Dickel (2005) realizou detecção de Salmonela pelos métodos convencional, PCR e ELISA, em amostras de alimentos de origem avícola e suínica para avaliar a sensibilidade, especificidade, eficácia e valores preditivos positivos e negativos entre os três testes, concluindo-se que o ELISA é o mais simples, rápido, sensível, específico, além de apresentar baixo custo.

Dickel et al. (2005) concluiu que a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) pode ser utilizada como teste de triagem para detecção de *Salmonella*, desde que confirmada a positividade pela metodologia convencional.

Com relação aos métodos modernos, rápidos ou práticos observa-se crescente tendência para a aprovação de “kits” comerciais, que reduzem os trabalhos de preparação do material requerido nas análises, aproximando-se de uma situação que, em análises clínicas, encontra-se já consolidados (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997).

## **2.5. Limite de detecção**

A implementação de procedimentos de garantia e de controle de qualidade, incluindo a utilização de materiais de referência, desempenham papel fundamental na viabilidade e rastreabilidade dos resultados, assim como na creditação dos laboratórios. A garantia da qualidade é definida pela International Organization for Standardization (ISO) como “todas as ações planejadas e sistemáticas necessárias para proporcionar a confiança adequada de que um produto, processo ou serviço, irá satisfazer determinados requisitos da qualidade” (LIGHTFOOT e MAIER, 2003).

A avaliação da qualidade em laboratório é o processo que usa medidas de controles extrínseco e intrínseco para determinar a qualidade dos dados produzidos, incluindo itens semelhantes como avaliação dos resultados das amostras, intercomparação de laboratório e auditorias. Eles são aplicados como testes de recuperação, tendência, precisão e limite de detecção (SMWW, 1992).

Um instrumento operacional analítico usualmente produz uma resposta mesmo quando nenhuma amostra está presente ou quando o branco é analisado. Todo programa da garantia da qualidade requer freqüentes análises do branco, a média e o desvio padrão (SMWW, 1992).

A dificuldade na elaboração do plano de identificação é que os resultados para testes de caracterização podem variar dependendo da quantidade do inóculo, da temperatura de

incubação, da duração do período de incubação, da composição do meio de cultura, da proporção superfície/volume do meio de cultura e do critério usado para definir reações positivas ou negativas. Entretanto, os resultados obtidos no teste de caracterização por um laboratório, geralmente não será exatamente o obtido por outro laboratório, embora os resultados de ambos possam ser consistentes. Portanto, a padronização dos procedimentos utilizando base internacional é mais indicada (HOLT et al., 1994).

Modernos ensaios laboratoriais podem desenvolver técnicas de medição para detectar cada vez mais níveis mínimos de concentração, por isso processos mais sensíveis continuam sendo desenvolvidos. Atualmente para determinar uma mensuração que indica ou não a presença de uma substância comparam o valor mensurado com o valor de origem. A comparação com o valor de origem leva ao conceito do limite de detecção. O limite de detecção é um nível acima que uma substância pode realmente ser identificada presente na amostra (COX, 2005).

Práticas atuais identificam vários limites de detecção, cada um deles tendo um propósito definido, como: o instrumento de limite de detecção (IDL), o baixo limite de detecção (LLD), o método do limite de detecção (MDL) e o limite de quantificação (LOQ). Ocasionalmente, o instrumento de medida do limite de detecção é usado como guia para determinar o método do limite de detecção (SMWW, 1992).

A partir de 1997, a ISO recomenda uma definição para o LOD relacionada com o nível de falso-positivo e falso-negativo e determina a menor concentração limite para ensaios qualitativos da presença ou ausência do constituinte analisado (LINNET e KONDRATOVICH, 2004). O LOQ determina o menor limite para melhor quantificar o constituinte analisado (LAWSON, 1994).

O Comitê Nacional americano para Padronização de Laboratórios Clínicos (NCCLS) define o limite de detecção como “a menor concentração ou a menor quantidade que um constituinte analisado presente pode ser determinado confiavelmente ou mensurado em condições definidas, ou seja, a menor quantidade que é claramente distinguível no branco”. A Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) utiliza uma similar definição, acrescentando que o LOD “... define o ponto em que a análise torna-se exatamente possível” (ARMBRUSTER, TILLMAN e HUBBS, 1994).

A U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) descreve o LOD como a “mínima concentração de uma substância que pode ser mensurada ou reportada com 99% de confiança quando o constituinte analisado é maior que zero” (EPA, 2005; RIPP, 1996).

O parâmetro essencial para determinação do limite de detecção (LOD) é a precisão nos dados. O LOD é o menor valor de um constituinte analisado, usualmente expressado por concentração, que pode ser estatisticamente distinguido do branco. Ele também pode ser calculado de duas formas: pela precisão para mensurações repetidas do branco ou pela dispersão dos dados na curva de calibração. Entretanto muitas maneiras diferentes para determinar o LOD já foram propostas, a maioria baseada em um dos dois métodos, diferenciando apenas no critério usado para distinguir o branco da amostra (ANDERSON, 1989).

A melhor forma considerada para a determinação do LOD em um ensaio é aquela que consiste na representação característica reportada na precisão e na tendência. Dois métodos são comumente usados, estatística aproximada e empírica. Uma série de amostras sem analito com matriz idêntica à amostra a ser analisada (branca) é testada onde são calculadas as medidas do branco e do desvio padrão (DP). O LOD corresponde à medida do branco mais 2 ou 3 DPs. Pequena concentração do constituinte analisado corresponde ao LOD. O LOD pode ser estatisticamente diferenciado do branco em 95-99% das vezes (ARMBRUSTER, TILLMAN e HUBBS, 1994; LINNET e KONDRATOVICH, 2004). Segundo Westgard (2000), o termo LOD é, algumas vezes, usado para descrever o limite para ausência desde que ele descreva a variação em números de contagem possível quando o correto resultado é zero.

O LOD para alguns procedimentos analíticos ou o ponto no qual a análise é exatamente viável, pode ser determinado por análise estatística baseada na mensuração de amostras branca (negativa) replicada ou pela abordagem empírica, que consiste na mensuração progressiva da mais diluída concentração do constituinte analisado. O limite de quantificação (LOQ) ou concentração em que resultados quantitativos podem ser reportados com alto grau de confiança pode ser determinado da mesma forma em ambos os processos (ARMBRUSTER, TILLMAN e HUBBS, 1994).

O método empírico ou experimental consiste em analisar uma série de amostras contendo concentrações do constituinte analisado cada vez mais diluídas. O LOD é a menor concentração na qual o resultado ainda satisfaz alguns critérios de aceitação predeterminados. Abaixo do LOD, os resultados falham e onde a análise não é possível (ARMBRUSTER, TILLMAN e HUBBS, 1994).

O método de limite de detecção empírico produz um número que representa o real limite de viabilidade de um ensaio e um valor que associa ao critério de aceitação em toda rotina analítica (ARMBRUSTER, TILLMAN e HUBBS, 1994).

A concentração mínima de um constituinte analisado que pode ser confiavelmente detectada ou mensurada em um procedimento analítico é uma importante característica do desempenho de um ensaio (LAWSON, 1994).

O conceito de LOD é um assunto de considerável interesse ao longo dos anos. O foco era geralmente em como fazer para declarar uma leitura de resultado significativamente maior que uma leitura do branco. Posteriormente, foi reconhecida a adição de um aspecto relevante, que considera a menor quantidade maior que zero de um analito já declarado significativamente (LINNET e KONDRATOVICH, 2004).

O LOD de um método não deve ser confundido com a chamada sensibilidade. De acordo com a ISO, a sensibilidade analítica diz respeito à inclinação em função da calibração. A sensibilidade da análise se refere a mínimas mudanças na quantidade do constituinte analisado. Essa definição expressa um conceito totalmente diferente do LOD (LINNET e KONDRATOVICH, 2004).

O laboratório pode determinar - e documentar - limites de detecção em ensaios quando aparecem situações inusitadas nas quais necessita testar concentrações e seu limite de detecção absoluto. A importância de desenvolver alguns guias para estabelecimento de limites de detecção é evidente quando nos damos conta de que diferenças significativas podem ser encontradas dependendo do método aplicado (LAWSON, 1994).

A agência que regulamenta os laboratórios americanos requer que a detecção limite seja verificada apenas para métodos de alta complexidade, métodos modificados de moderada complexidade e métodos de moderada complexidade que não sejam reconhecidos pelo Food and Drugs Administration (WESTGARD, 2000).

Métodos para detecção, identificação e quantificação já são muitos e rigorosamente estudados, portanto validados por órgãos competentes, no entanto não está disponível uma metodologia que avalie os limites de detecção de cada método para que seja aplicado nos diferentes laboratórios e assim avaliado em condições particulares e adversas.

Para determinação do LOD é necessária a construção de uma curva padrão de crescimento microbiano que possibilite observar o comportamento do microrganismo estudado e o tempo de incubação correspondente à fase estacionária. O modelo matemático é fundamental para os métodos de previsão e depende do tempo de crescimento da população microbiana e das condições ambientais particulares de cada microrganismo (PERNI, ANDREW e SHAMA, 2005).

A representação típica do desenvolvimento de uma cultura bacteriana é o logaritmo da concentração celular versus o tempo, que em muitos casos, resulta em uma curva sigmóide.



Uma possível solução empírica é ajustar esses dados a uma função sigmóide. Em microbiologia de alimentos muitas funções básicas sigmóides, como o modelo empírico, podem ser amplamente utilizadas. Entretanto, dada a diversidade de métodos, a procura por modelos de crescimento empírico tem aumentado (BARANYI, ROBERTS e McCLURE, 1993).

Muitas abordagens para a modelagem do desenvolvimento bacteriano podem ser encontradas na literatura de microbiologia. De acordo com Roels e Kossen (1978), esses problemas que foram propostos quando apresentava biomassa homogênea, a concentração da massa como única variável dependente do sistema e parâmetros ambientais como temperatura, química, etc, não estavam envolvidas no modelo (BARANYI, ROBERTS e McCLURE, 1993).

Modelos matemáticos foram desenvolvidos por diversos autores para o estudo do desenvolvimento microbiano, podendo ser aplicados para análise em diferentes condições físicas e químicas, para investigar efeitos de antimicrobianos, para avaliação de meios de cultura ou para construção de modelos usados em microbiologia de alimentos ou fermentação microbiana (LÓPEZ et al., 2004).

Alguns autores tiveram confiança na mensuração matemática para fineza de ajuste, enquanto que outros focaram na comparação direta de parâmetros particulares de crescimento como foi previsto por vários modelos (PERNI, ANDREW e SHAMA, 2005).

O modelo microbiológico reflete a precisão e ao mesmo tempo a versatilidade dos modelos matemáticos, podendo descrever a evolução microbiana em produtos alimentícios conforme as condições ambientais, em situações conhecidas ou mensuradas (VAN IMPE et al., 2005).

Todos os modelos propostos, como apresentados a seguir, utilizam os mesmos parâmetros quanto à concentração microbiana ( $L_0$ ), tempo ( $t$ ), taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) e crescimento máximo em log ( $L_\infty$ ) (LÓPEZ et al., 2004).

Linear LIN	$L_0, \quad t \leq \tau$ $L_0 + \mu(t - \tau), \quad \tau < t < t_f$ $L_\infty, \quad t \geq t_f$
Logistic LOG	$\frac{L_\infty}{1 + e^{-\lambda(t-t^*)}}$
Gompertz GMP	$L_\infty \exp[-e^{-\lambda(t-t^*)}]$
von Bertalanffy VNB	$L_0 + (L_\infty - L_0)(1 - e^{-\lambda t})^{1/u}$
Richards RCH	$\frac{L_\infty}{[1 + v e^{-\lambda(t-t^*)}]^{1/u}}$
Morgan MRG	$\frac{L_0 K^u + L_\infty t^u}{K^u + t^u}$
Weibull WBL	$L_\infty - (L_\infty - L_0) \exp[-(\lambda t)^u]$
France FRN	$L_0, \quad t < \tau$ $L_\infty - (L_\infty - L_0) e^{[-\lambda(t-\tau) + d(\sqrt{t} - \sqrt{\tau})]}, \quad t \geq \tau$
Baranyi and Roberts BAR	$L_0 + \mu_{\max} t + L_1 - L_2,$ $L_1 = \ln[e^{-\mu_{\max} t} - e^{-\mu_{\max}(t+T)} + e^{-\mu_{\max} T}],$ $L_2 = \ln \left[ 1 + \frac{e^{\mu_{\max}(t-T)} + e^{-\mu_{\max} T}}{e^{(L_\infty - L_0)}} \right]$

Fonte: López et. al. 2004.

Um dos pontos atrativos para o modelo de Baranyi além da boa capacidade de previsão é o fato dele ser um modelo dinâmico que pode considerar a variação de tempo nas condições ambientais (GRIJSPEERDTI e VANROLLEGHEM, 1999).

O aumento das exigências nas análises microbiológicas evidencia a importância da implantação de programas de garantia de qualidade nos laboratórios, pois resultados incorretos podem causar um forte impacto econômico e na saúde pública. Para isso é essencial a aplicação do LOD nos ensaios microbiológicos, aumentando a confiabilidade dos resultados.

# Objetivos

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver metodologia para estabelecimento de limite mínimo de detecção de métodos de análise de *Salmonella* spp. aplicados a alimentos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ❑ Avaliar o comportamento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e identificar a fase estacionária do desenvolvimento.
- ❑ Comparar modelos matemáticos utilizados nos ajuste dos dados para construção da curva de desenvolvimento microbiano com o modelo experimental.
- ❑ Determinar os limites mínimos de detecção dos métodos AOAC 967.26 (tradicional) e AOAC 996.08 (rápido/prático) utilizados para análises de *Salmonella* spp. em alimentos.
- ❑ Estabelecer a sensibilidade e a precisão da metodologia proposta para detecção limite de *Salmonella* spp.
- ❑ Avaliar a repetibilidade da metodologia proposta.

# Materiais e métodos

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da experimentação

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos *Nonete Barbosa Guerra* – LEAAL, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

### 4.2 Material

#### 4.2.1 Cepa

Foi utilizada cepa liofilizada de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) adquirida de coleção de cultura da Fundação André Tosello, hidratada com 0,5mL de solução salina a 0,85% (NaCl) e recuperada em 10 mL de caldo BHI por 24h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

Porções da cultura recuperada foram transferidas para 22 tubos contendo agar nutriente inclinado. Os tubos foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24h e após o crescimento foram estocados sob refrigeração a  $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

#### 4.2.2. Equipamentos

- ❑ Agitador de tubos Quimis;
- ❑ Autoclave;
- ❑ Balança semi-analítica Mettler PN1210, resolução 0,01g;
- ❑ Banho-maria, Fanen;
- ❑ Contador de colônias;
- ❑ Espectrofotômetro Genesys 10 vis;
- ❑ Estufa bacteriológica, 30D Tecnal TE391;
- ❑ Pipetadores manuais;

- ❑ Potenciômetro Micronal B474;
- ❑ Termômetros calibrados;
- ❑ Vitek Systems MINI VIDAS (bioMérieux).

#### **4.2.3 Outros materiais**

- ❑ Alça descartável calibrada 1µL;
- ❑ Algodão hidrofóbico;
- ❑ Bico de Bunsen;
- ❑ Cubetas de vidro;
- ❑ Espátula;
- ❑ Lâmina de vidro;
- ❑ Ponteiros descartáveis;
- ❑ Tela de amianto;
- ❑ Tripé;
- ❑ Vidraria;

#### **4.2.4 Meios de cultura e reagentes**

- ❑ Agar – Merck 1.016151000;
- ❑ Agar Bismuto Sulfito (BS) – Merck 1.05418;
- ❑ Agar Entérico de Hecktoen (HE) – Merck 1.11681;
- ❑ Agar Lisina Ferro (LIA) – Merck 1.11640;
- ❑ Agar Nutriente (AN) – Merck 1.05450;
- ❑ Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) – Merck 1.03915;
- ❑ Agar Xilose Lisina Desoxicilato (XLD) – Merck 1.05287;
- ❑ Biselenito de sódio – Oxoid LP0121A;
- ❑ Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) – Acumedia 7116A;
- ❑ Caldo lactose – Oxoid CM0137;
- ❑ Caldo M – Acumedia 7296A;
- ❑ Caldo Selenito Cistina – Oxoid CM699;
- ❑ Caldo Tetrionato – Oxoid CM0029;

- ❑ Cloreto de sódio (NaCl);
- ❑ Cristal de violeta;
- ❑ Kit *Salmonella* VIDAS (bioMerieux);
- ❑ Lugol;
- ❑ Safranina;
- ❑ Solução aquosa de iodo a 2%;
- ❑ Solução aquosa de Verde Brilhante a 0,1%.

### 4.3. Metodologia

#### 4.3.1 Controle de Qualidade Laboratorial (CQL)

Para validação de métodos laboratoriais, a norma ISO 17025 preconiza a implantação de procedimentos de qualidade com controle de pontos críticos considerados de importância fundamental na rastreabilidade dos resultados em relação a: analista; equipamentos; reagentes e meios de cultura; amostras e etapas dos procedimentos técnicos, minimizando os erros analíticos. Os controles aplicados nestes ensaios podem ser observados no Quadro 1:

Quadro 1. Controles de pontos críticos utilizados em laboratórios de ensaios microbiológicos.

CONTROLES	FERRAMENTAS	FREQÜÊNCIA
Temperatura de equipamentos	Termômetros calibrados	Diária
Temperatura de esterilização e de descontaminação	Indicador químico Indicador biológico	A cada operação Semanal
Calibração de equipamentos	Laboratórios de calibração credenciados a RBC	Semestral
Meios de cultura	Teste de produtividade e seletividade	A cada lote
Qualidade do ar da sala asséptica	Exposição de placas para bolores e leveduras e para contagem total de aeróbio por 15 minutos	Diária
	Irradiação com UV por 20 minutos	Diária
Assepsia de bancadas	Contato de placas para bolores e leveduras e para contagem total de aeróbio em bancadas	Diária
	Irradiação UV por 20 minutos	Diária
	Aplicação de álcool a 70%	A cada operação



### 4.3.2 Preparação de meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes com medida do pH em potenciômetro com resolução = 0,1 (Micronal B474) e quando necessário, ajuste com solução ácida ou básica de acordo com a especificação do rótulo.

A validação dos meios de cultura foi realizada através do teste de produtividade e seletividade proposto pelo MAARA (1991/1992), conforme metodologia descrita nos anexos I e II.

### 4.3.3 Cinética microbiana

#### *Preparação do inóculo*

Da cultura refrigerada foi transferida uma alçada de 1 $\mu$ L para agar nutriente inclinado e em seguida incubada a 35°C  $\pm$  1 por 24 horas. Do cultivo foi preparada uma suspensão com 4mL de solução salina a 0,85%, de onde foi retirada uma alçada de 1 $\mu$ L para inoculação em 500mL de caldo BHI contido em um frasco com tampa de rosca que foi mantido a 35°C  $\pm$  1 enquanto transcorreu o experimento. O inóculo utilizado apresentou concentração inicial de 10<sup>3</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) /mL.

#### *Procedimento para construção da curva de desenvolvimento microbiano*

A cinética do microrganismo foi estabelecida com base nas metodologias de Gupta, Sharma e Vyas (1995) e López et al. (2004). Uma alíquota de 1mL do inóculo foi submetida à leitura espectrofotométrica na faixa de 600 nm em intervalos de 30 minutos ou 1 hora, dependendo da velocidade de crescimento do microrganismo até 24 horas. Desta forma foi determinada a densidade óptica de cada ponto. Foi medido o pH em cada um destes pontos para observação da variação da concentração de íons H<sup>+</sup> do meio durante o crescimento microbiano.

Em paralelo, foram preparadas diluições sucessivas em solução salina a 0,85% (NaCl) até  $10^{-11}$ . De cada diluição devidamente homogeneizada em agitador mecânico por aproximadamente 5 segundos foram retiradas duas porções de 1mL para plaqueamento “pour plate” em duplicata em agar BHI e incubadas em aerobiose a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24 horas.

Os dados obtidos nas contagens por diluição (UFC/mL) foram submetidos a transformação logarítmica (neperiano) possibilitando a construção da curva de crescimento de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) até 24 horas. A “taxa de crescimento máximo” foi estimada dividindo-se o dado logaritmo máximo da biomassa pelo tempo (h) no qual se observou a maior contagem.

Na Figura 1 estão apresentadas as etapas para obtenção da cinética microbiana:

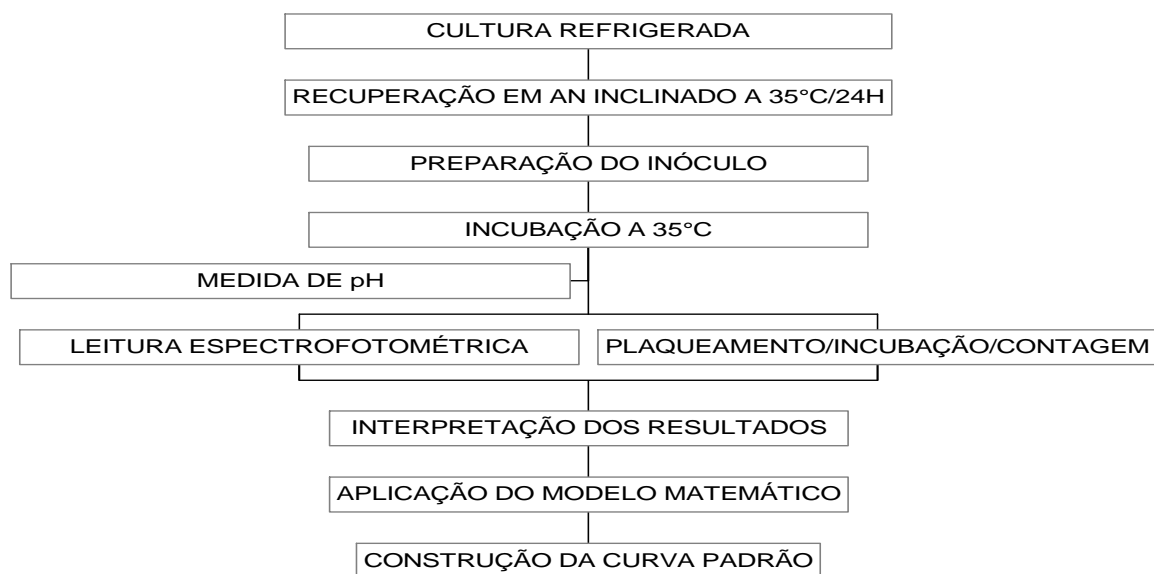


Figura 1. Etapas do procedimento para estabelecimento da cinética microbiana.

### *Considerações matemáticas*

Para construção da curva padrão expressada em concentração celular foram utilizados os modelos de Baranyi e Roberts (1995) e quadrático. No primeiro, o crescimento exponencial microbiano é representado pela equação geral:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-v \cdot t} + e^{-h_0} - e^{-v \cdot t - h_0}) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-v \cdot t} + e^{-h_0} - e^{-v \cdot t - h_0})} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

onde:

$y(t) = \ln(x(t))$  com  $x(t)$  como concentração celular (UFC/mL)

$y_0 = \ln(x_0)$ ,  $y_{\max} = \ln(x_{\max})$ ,  $x_0$  sendo o inicial e  $x_{\max}$  o assintótico concentração celular, respectivamente

$\mu_{\max}$  é a taxa de crescimento máximo específico ( $h^{-1}$ )

$m$  é o parâmetro de curvatura que caracteriza a transição para a fase exponencial

$v$  é o parâmetro de curvatura que caracteriza a transição da fase exponencial

$h_0$  é um parâmetro dimensional quantitativamente do estado fisiológico inicial das células.

Para isto, o tempo lag  $\lambda(h)$  pode ser calculado como  $h_0/\mu_{\max}$ .

Foi também sugerida a aplicação do modelo quadrático para adequação dos dados por considerar a sua simplicidade na elaboração dos cálculos.

A contagem de microrganismos obtida experimentalmente foi modelada como função quadrática do tempo. O modelo apresenta a seguinte forma geral:

$$Y = aT^2 + bT + c$$

em que:  $Y$  = quantidade de microrganismo em ln

$T$  = tempo em horas

#### 4.3.4 Proposta metodológica para determinação do limite mínimo de detecção (LOD)

##### *Preparação do inóculo*

Da cultura refrigerada foi transferida uma alçada de 1  $\mu$ L da massa bacteriana para agar nutriente inclinado que foi incubado a  $35^\circ\text{C} \pm 1$  por 24 horas. Do cultivo foi preparada uma

suspensão com 4mL de solução salina a 0,85% (NaCl). Da suspensão foi transferida uma alíquota de 1µL para 50 mL de caldo BHI contido em um frasco com tampa de rosca e incubado a 35°C ± 1. Com base na curva de desenvolvimento microbiano (curva padrão), utilizou-se o inóculo com 11 horas de recuperação em caldo BHI, representando o início da fase estacionária avaliada através da leitura da densidade óptica e posterior ajuste da absorbância a aproximadamente 0.750A com caldo BHI estéril para padronização da concentração celular em 10<sup>9</sup> UFC/mL.

### ***Procedimento para determinação do limite mínimo de detecção (LOD)***

Após homogeneização do inóculo por 25 vezes na rotação do punho, 25mL foi transferido para 225mL de solução salina a 0,85% (NaCl), resultando na diluição 10<sup>-1</sup>. Desta foram preparadas diluições sucessivas em solução salina a 0,85% na proporção 10:90mL até 10<sup>-11</sup>. Cada diluição foi homogeneizada por 25 vezes na rotação do punho. A não utilização de homogeneização mecânica é justificada por Koneman et al. (1999) e Trabulsi et al. (2004) para evitar possíveis quebras da parede celular, pois bactérias Gram-negativas como *Salmonella*, apresentam uma menor concentração de peptidoglicano que as bactérias Gram-positivas o que torna mais suscetíveis a quebras.

Alíquotas de 25mL das 4 últimas diluições (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-11</sup>) e do branco (caldo BHI) foram inoculadas em 225 mL de caldo lactosado. Das amostras inoculadas em caldo lactosado foram realizados os ensaios para análise de *Salmonella* spp. de acordo com metodologias preconizadas por AOAC 967.26 e 996.08 (AOAC, 2002). Paralelamente 1mL das mesmas diluições foram plaqueadas “pour plate” em duplicada em agar BHI para quantificação do número de células viáveis inoculado. Foi selecionada a diluição cujas duplicatas de placas apresentaram crescimento entre 20 e 200 colônias, de onde foi calculada a média aritmética. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

O procedimento utilizado para determinação do limite de detecção de métodos de análise de *Salmonella* spp. aplicados em alimentos se apresenta esquematizado no fluxograma representado na Figura 2:

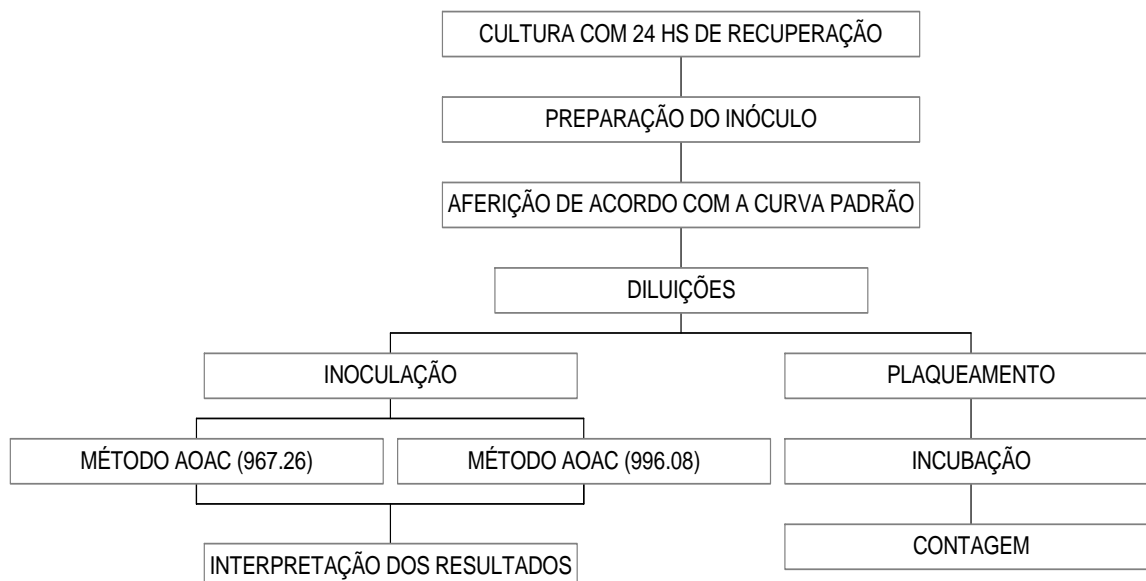


Figura 2. Procedimento para determinação do limite mínimo de detecção para método qualitativo de *Salmonella*.

#### 4.3.5 Métodos utilizados

Foram testados dois métodos para detecção de *Salmonella* usualmente utilizados em laboratórios de alimentos: 1 método tradicional (967.26) baseado no enriquecimento, isolamento e identificação por reação a provas bioquímicas e outro método presuntivo (996.08), também chamado de rápido, que tem como princípio a detecção através de teste imunoenzimático (Enzyme Liked Immunoflorescente Assay).

#### *Interpretação dos resultados*

Na metodologia tradicional, as colônias consideradas suspeitas de *Salmonella* spp se apresentam no agar XLD com coloração negra e/ou rosas com centro negro, lisas, arredondadas com bordos regulares; no agar HE apresentam coloração azul esverdeada com centro negro, lisas, arredondada com bordos regulares e no agar BS coloração cinza, com brilho metálico, lisas, arredondadas com bordos regulares.

Foram considerados positivos para *Salmonella* spp os tubos com crescimento em TSI que apresentaram base amarelada pela produção de ácido, enegrecimento no local da picada

pela produção de H<sub>2</sub>S e ápice sem alteração de cor. Em LIA, os tubos com crescimento de *Salmonella* spp apresentaram-se com cor do ápice e da base inalteradas pela não produção de ácido e enegrecimento do local da picada pela produção de H<sub>2</sub>S.

No ensaio imunoenzimático, com o sistema Vidas os resultados são analisados automaticamente. O aparelho efetua duas medidas de fluorescência no barrete de leitura específico para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco do barrete antes do substrato entrar em contato com o cone. A segunda leitura é efetuada após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do RFV (Relative Fluorescence Value) é o resultado da diferença das duas medidas interpretado pelo sistema VIDAS da seguinte forma:

$$\text{Valor do teste} = \text{RFV amostra} / \text{RFV calibrador}$$

O sistema estabelece o limiar de 0,23 para a interpretação dos resultados. Valores do teste inferiores ao valor limiar indicam uma amostra com antígenos para *Salmonella* spp não detectáveis, ou seja, ausência. O resultado com valor superior ou igual ao do valor limiar indica uma amostra contaminada com *Salmonella* spp, ou seja, presença.

#### **4.3.6 Validação do método proposto para LOD**

A proposta de LOD foi validada de acordo com o “protocolo de validação de métodos microbiológicos alternativos da NordVal” baseado no guia ISO 16140:2003 utilizando 20 repetições para cada método testado: AOAC 967.26 e 996.08 (NordVal, 2005).

#### ***Interpretação dos resultados***

O LOD de cada método foi estabelecido com base na faixa de contagem obtida nas 20 repetições e expressado em número mínimo de células de *Salmonella* spp. detectado em 25mL de amostra (UFC/25mL).

#### **4.4 Análise estatística**

Na comparação dos dados resultantes da aplicação do modelo proposto para LOD foi utilizado o teste T de Student e no ajuste dos modelos matemáticos de Baranyi e quadrático foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com auxílio do programa computacional Statistic 6.0 (STATSOFT, 1997).

## Resultados e discussão

---



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação dos meios de cultura

Os resultados dos testes de produtividade e seletividade realizados através do método ecométrico para avaliação de meios de cultura indicaram que todos se encontravam satisfatórios para utilização conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Validação dos meio sólidos seletivos e não seletivos com cultura de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

MEIO DE CULTURA	ICA	PRODUTIVIDADE	SELETIVIDADE
Agar BHI	3,8	Satisfatória	Satisfatória
Agar BS	4,5	Satisfatória	Satisfatória
Agar HE	5	Satisfatória	Satisfatória
Agar LIA	4,3	Satisfatória	Satisfatória
Agar nutriente (AN)	3,5	Satisfatória	Satisfatória
Agar plate count	3,9	Satisfatória	Satisfatória
Agar TSI	5	Satisfatória	Satisfatória
Agar XLD	5	Satisfatória	Satisfatória

ICA = Índice de crescimento absoluto

Tabela 2. Validação dos meios líquidos seletivos e não seletivos com cultura de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

MEIO DE CULTURA	TURVAÇÃO		PLACA	RESULTADO
Caldo lactosado	+	+	Crescimento	Satisfatório
Caldo BHI	+	+	Crescimento	Satisfatório
Caldo tetrionato	+	+	Crescimento	Satisfatório
Caldo selenito cistina	+	+	Crescimento	Satisfatório
Caldo M	+	+	Crescimento	Satisfatório

Os resultados demonstram confiança na qualidade dos meios de cultura seletivos e não seletivos testados para o experimento com a cultura utilizada. Nascimento et al. (2000) também obtiveram resultados satisfatório na detecção de *Salmonella* spp em carcaça de frango com agar XLD e agar HE. Com relação aos caldos de enriquecimento, os dados foram satisfatórios como os de Giombelli e Lopes da Silva (2002) que também obtiveram eficiência com caldo tetrionato-verde brilhante e caldo selenito cistina em análise de *Salmonella* spp.

## 5.2 Cinética microbiana

Os dados das leituras da densidade óptica e das contagens em placas obtidos para o estabelecimento da cinética de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Densidade óptica e contagem de *Salmonella typhimurium* por 24 horas.

AMOSTRA	DENSIDADE ÓPTICA (A)	CONTAGEM (UFC/mL)	FASE DE CRESCIMENTO
Branco	0,196	0	FASE LAG
0h	-0,001	$3,0 \times 10^3$	
0h30m	0,001	$1,2 \times 10^4$	
1h	0,000	$1,0 \times 10^4$	
1h30m	0,001	$1,0 \times 10^4$	
2h	0,001	$1,1 \times 10^4$	
2h30m	0,001	$3,0 \times 10^4$	
3h	0,001	$2,3 \times 10^5$	
3h30m	0,002	$6,8 \times 10^5$	
4h	0,001	$1,0 \times 10^6$	
4h30m	0,005	$1,0 \times 10^7$	
5h	0,007	$9,5 \times 10^6$	
5h30m	0,006	-	
6h	0,008	$2,1 \times 10^7$	
7h	0,030	$2,5 \times 10^7$	
7h30m	0,048	$4,8 \times 10^7$	FASE ESTACIONÁRIA
8h	0,098	$9,2 \times 10^7$	
8h30m	0,187	$2,0 \times 10^8$	
9h	0,331	$2,4 \times 10^9$	
9h30m	0,550	$9,0 \times 10^8$	
10h	0,745	$3,2 \times 10^9$	
10h30m	0,805	$7,2 \times 10^9$	
11h	0,797	$3,7 \times 10^9$	
12h	0,757	$6,0 \times 10^9$	
13h	0,770	$2,4 \times 10^{10}$	
14h	0,770	$3,0 \times 10^9$	
15h	0,823	$2,0 \times 10^{11}$	
16h	0,834	$1,0 \times 10^9$	
17h	0,820	$1,4 \times 10^{10}$	
18h	0,889	$1,0 \times 10^9$	
19h	0,912	$2,0 \times 10^{10}$	
20h	0,978	$4,7 \times 10^9$	
21h	0,998	$2,3 \times 10^9$	
22h	1,207	$1,0 \times 10^9$	
23h	1,077	$2,0 \times 10^9$	
24h	1,114	$5,0 \times 10^9$	

Resolução 0,001A

Basti e Razavilar (2004) obtiveram em seus experimentos com caldo BHI, a leitura em densidade óptica de 0,030A na faixa de 600nm, estimando uma concentração de  $10^7$  UFC/mL para cepa do gênero *Salmonella*. Neste experimento observou-se a reprodução desse dado como pode ser verificado no tempo correspondente a 7h com contagem de  $2,5 \times 10^7$  UFC/mL conforme a tabela 3.

Cogan et al. (2001) com *S. enteritidis* utilizando densidade óptica de 0,200A no comprimento de onda de 600nm obtiveram aproximadamente  $2 \times 10^8$  células por mL em caldo nutriente na fase estacionária com 16 horas de incubação. Resultados semelhantes foram encontrados neste experimento e pode ser observado na tabela 3, onde *Salmonella typhimurium* inoculada em caldo BHI com 8h30m de incubação obteve a mesma concentração microbiana na leitura de 0,187A.

O estudo da cinética de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 em 24 horas possibilitou a construção da curva de crescimento observada na Figura 3 (modelo experimental). As curvas construídas a partir da modelagem dos dados obtidos no modelo experimental mediante aplicação dos modelos matemáticos de Baranyi e quadrático estão também demonstradas nesta figura.

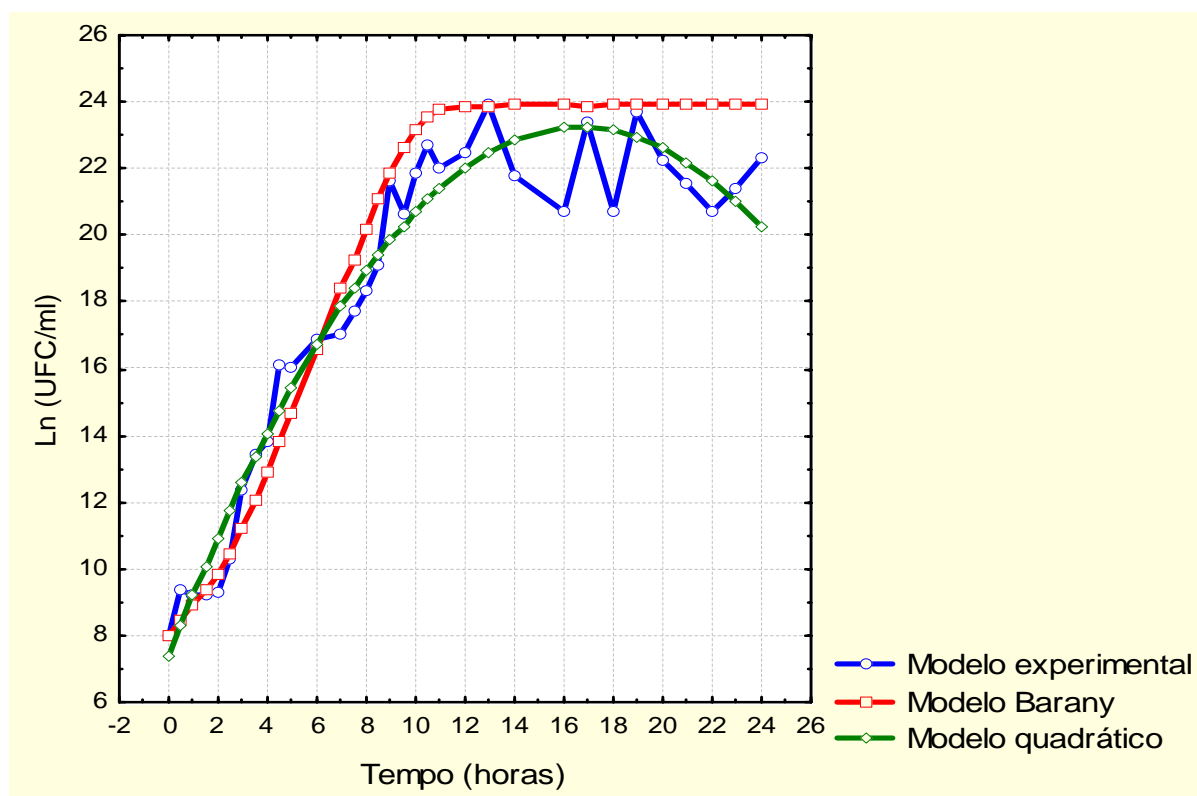


Figura 3. Curva de crescimento microbiano para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Uma análise de regressão foi aplicada para modelar os dados do crescimento do microrganismo (Tabela 3) ao modelo de Baranyi em função do tempo. De acordo com a Tabela 4 podemos observar que a regressão foi significativa pois o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,9, porém não representa necessariamente, um bom ajuste (VIEIRA, 2004). O mesmo resultado foi obtido ao aplicar a análise de regressão aos dados acima citados como função quadrática do tempo, obtendo  $R^2$  superior a 0,9 (Tabela 5). Podemos também observar nestas tabelas que no modelo quadrático obteve-se o menor resíduo e que seus coeficientes de regressão foram significativos ( $p < 0,05$ ) como mostra a Tabela 6. Conforme Vieira (2004) para verificar o comportamento do modelo ajustado ao conjunto dos dados experimentais além da análise de variância é necessária a análise de resíduos.

Tabela 4. Análise de variância para o ajuste do modelo de Baranyi aos dados obtidos experimentalmente.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	$F_c$	$F_t$
Regressão	1178,1088	1	1178,1088	416,69	4,16
Resíduo	87,6465	31	2,8273		
Total	1265,7553	32		$R^2=0,93$	

$F_c$  : F calculado;  $F_t$ : F tabelado

Tabela 5. Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados obtidos experimentalmente.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	$F_c$	$F_t$
Regressão	791,2097	2	395,6048	288,99	3,32
Resíduo	41,0657	30	1,3689		
Total	832,2754	32		$R^2=0,95$	

$F_c$  : F calculado;  $F_t$ : F tabelado

Tabela 6. Coeficientes de regressão da modelagem do crescimento de microrganismos através da equação quadrática.

Coeficientes		
a *	b *	c *
-0,06	1,90	7,37

\*significativos ( $p < 0,05$ )

Verificando nas Figuras 4 e 5 a distribuição de resíduos podemos observar pontos dispersos em torno do eixo X para o modelo quadrático, sem qualquer tendência aparente, ou seja, a distribuição dos resíduos é aleatória, ao passo que para o modelo de Baranyi, a distribuição dos resíduos não apresenta aleatoriedade. Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001), o emprego do Teste F pressupõe uma distribuição normal dos resíduos, e não uma evidência de anormalidade na sua distribuição. Esta aleatoriedade permite concluir a significância do ajuste. Assim, comparando os dois modelos, podemos afirmar que o modelo quadrático teve melhor ajuste aos dados observados, lembrando que a validade das equações obtidas nesta pesquisa restringe-se aos limites dos fatores experimentais utilizados. Além disso, o modelo quadrático mostrou uma alternativa mais simplificada como ferramenta de cálculo para moldar os dados experimentais para construção da curva de crescimento microbiano.

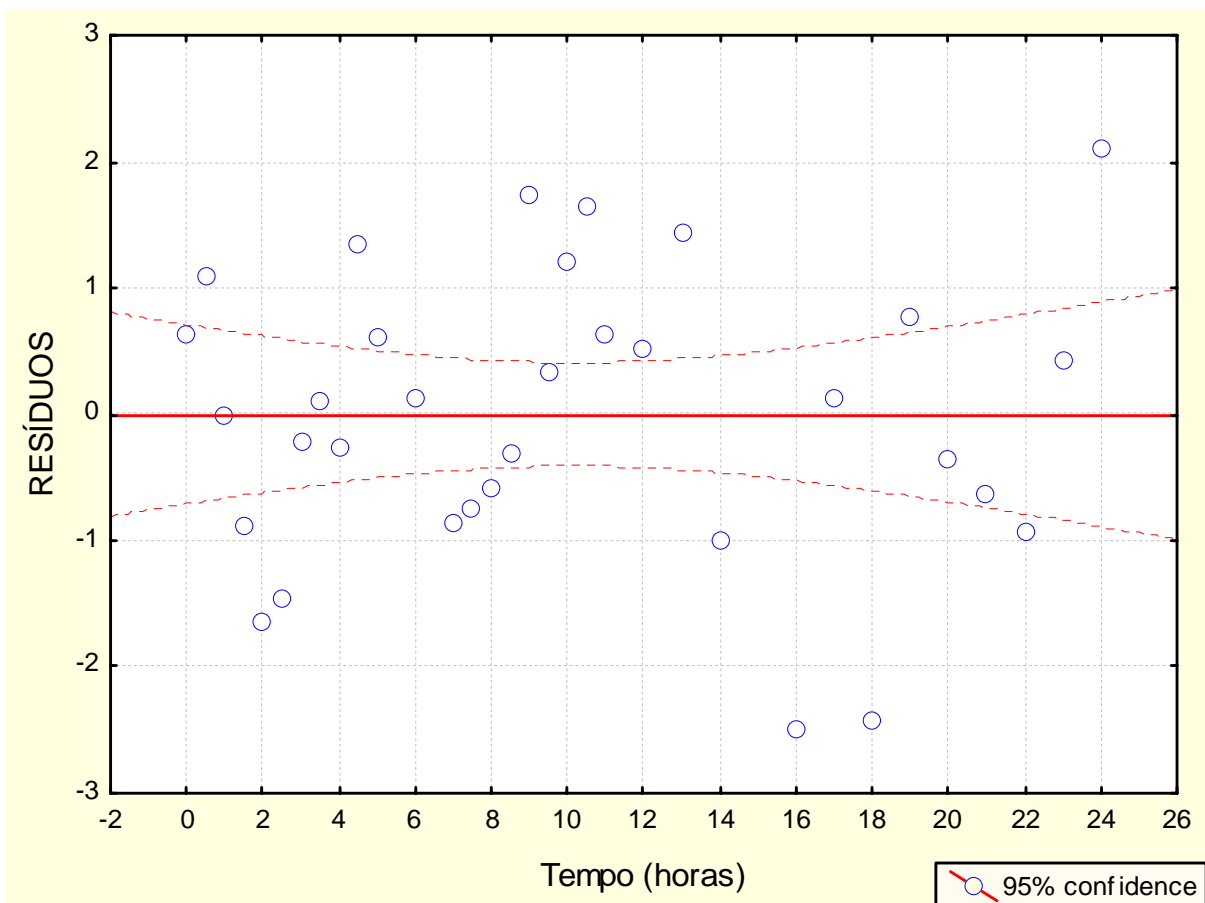


Figura 4. Distribuição dos resíduos obtidos no ajuste dos dados experimentais ao modelo quadrático.

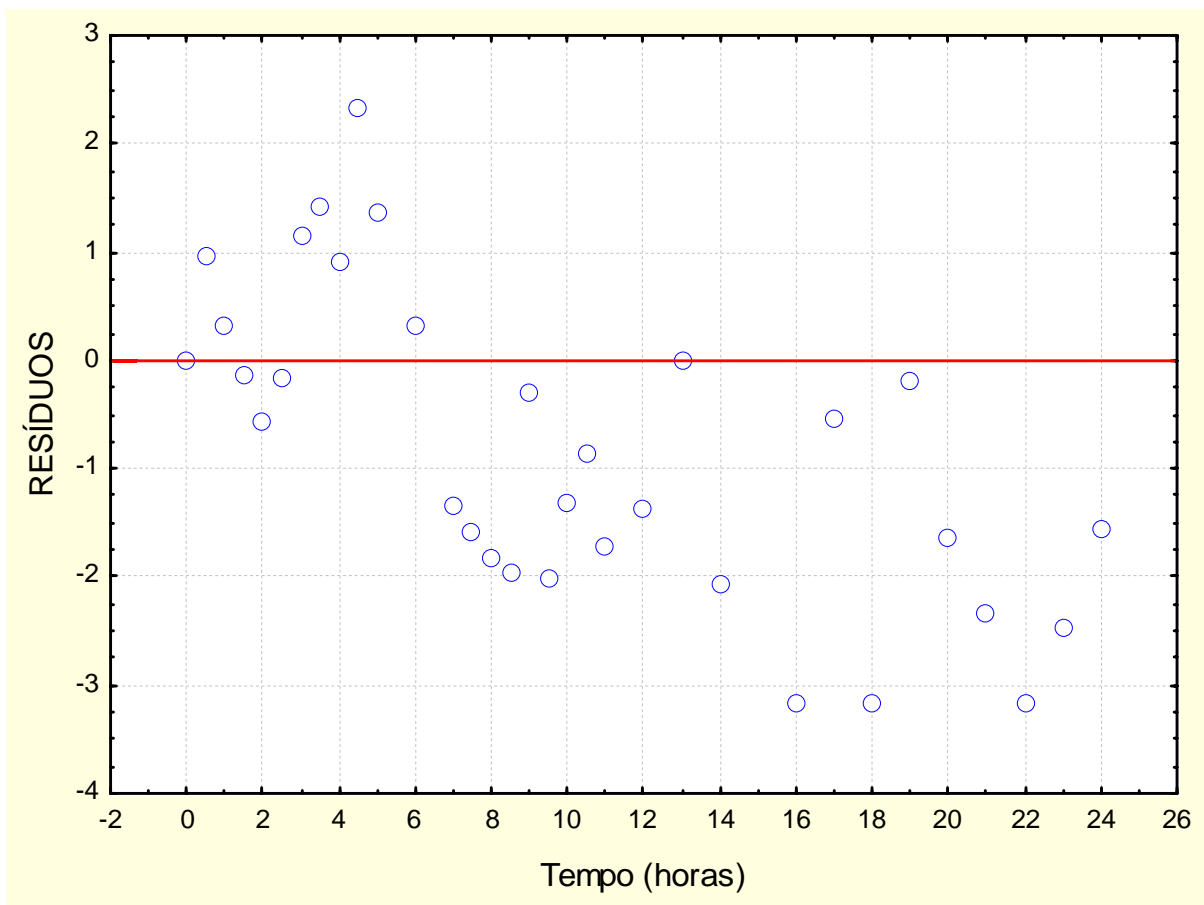


Figura 5. Distribuição dos resíduos obtidos no ajuste dos dados experimentais ao modelo de Baranyi.

Observou-se semelhança entre a curva do modelo experimental e as dos modelos matemáticos de Baranyi e quadrático, no entanto, constatou-se diferença na fase de adaptação ou fase lag que só foi observada no modelo experimental (Figura 3). Os modelos matemáticos demonstraram crescimento imediato e linear da fase lag até o final da fase exponencial. Esta diferença pode ser justificada uma vez que o modelo matemático é simplificado e não considera fatores limitantes para o crescimento microbiano como composição do meio de cultura, temperatura de incubação, tempo de adaptação, concentração de oxigênio, exaustão de substrato, concentração de metabólitos tóxicos e espaço biológico (BARANYI e ROBERTS, 1995; KONEMAN et al., 1999; TRABULSI et al., 2004).

Além disso, a fase estacionária no modelo experimental apresentou oscilação em até uma unidade logarítmica, demonstrando que mesmo numa fase dita estacionária o microrganismo mantém a capacidade de adaptação, o que possibilita uma multiplicação celular mesmo em condições ambientais adversas. O mesmo não pôde ser observado nos modelos matemáticos.

Um determinado espaço físico, denominado espaço biológico, é necessário para que ocorra o crescimento individual bacteriano. Não há nenhuma explicação razoável para este fenômeno, porém, uma hipótese sugere que, “para haver crescimento e multiplicação, deve existir pelo menos uma concentração mínima de nutrientes por unidade de superfície ou de concentração biológica”. Quando uma cultura aumenta, há um decréscimo proporcional na quantidade de nutrientes até o ponto em que a concentração de nutrientes por microrganismo atinge um nível crítico e a multiplicação cessa (TRABULSI et al., 2004).

Como a taxa de crescimento é dependente da concentração do substrato, a redução da disponibilidade de nutrientes durante a fase exponencial leva ao declínio quando o substrato é consumido. No experimento, a fase estacionária ficou estabelecida no período entre 10 a 24h. A oscilação observada na fase estacionária se justifica pelo uso alternativo de outra fonte de energia para manutenção da célula microbiana. Reservas nutritivas internas, de metabólitos intermediários e as próprias estruturas dos microrganismos podem servir como fonte de energia para a atividade respiratória e assim manter a bactéria viável por um tempo considerável (SCHLEGEL, 1997; KONEMAN et al., 1999; TORTORA, FUNKE e CASE, 2000).

A morte celular observada após 24h tem como fatores a variação de pH e do potencial de oxido-redução (Eh) do meio de crescimento, pois culturas bacterianas são difíceis de serem tamponadas e controladas. A variação do pH pode ser observada na Figura 6 (SCHLEGEL, 1997; TRABULSI et al., 2004; JAY, 2005).

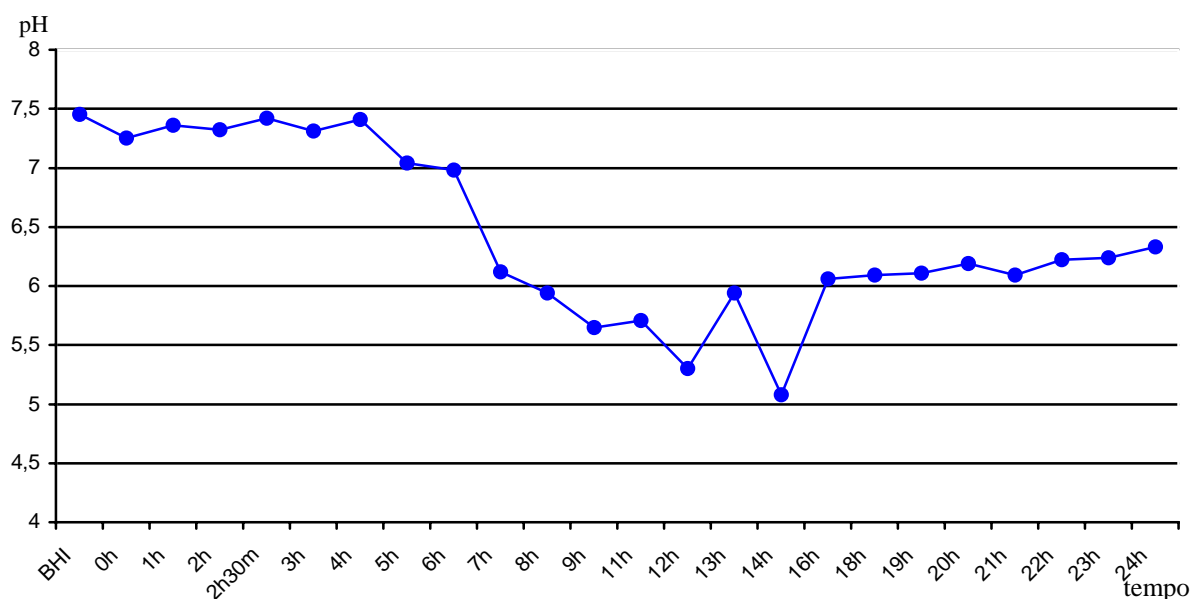


Figura 6. Monitoramento do pH durante a cinética de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por 24 horas.

O pH medido durante as 24 horas se apresentou como o esperado. A produção de ácido pela bactéria leva ao abaixamento do pH no início do desenvolvimento até o início da fase estacionária, entre 11 e 12 horas. A partir deste ponto inicia-se a degradação dos componentes protéicos com formação de metabólitos básicos como a amônia. Esse metabólito pode alterar a permeabilidade da membrana bacteriana, pois acredita-se que a medida que o pH se afasta da neutralidade, os íons presentes no meio afetam as proteínas de superfície, as permeases, impedindo assim uma penetração adequada dos nutrientes (KONEMAN et al., 1999).

### 5.3 Limite mínimo de detecção

Os dados obtidos nos experimentos, necessários para estabelecimento do LOD dos métodos estudados podem ser conferidos na Tabela 7.

Tabela 7. Dados obtidos para estabelecimento do LOD

ENSAIOS	LEITURA INICIAL (A)	AJUSTE (A)	CONTAGEM UFC/mL	LOD VIDAS (AOAC 996.08) UFC/25mL	LOD TRAD. (AOAC 967.27) UFC/25mL
E1	0,753	0,753	3 X 10 <sup>9</sup>	3	3
E2	0,839	0,748	1 X 10 <sup>10</sup>	1	1
E3	0,829	0,758	5 X 10 <sup>10</sup>	5	5
E4	0,859	0,812	1,1 X 10 <sup>9</sup>	1	1
E5	0,871	0,757	1,5 X 10 <sup>9</sup>	2	2
E6	0,851	0,729	8 X 10 <sup>10</sup>	8	8
E7	0,867	NR	2 X 10 <sup>10</sup>	2	2
E8	0,872	0,758	2 X 10 <sup>10</sup>	2	2
E9	0,800	0,757	4 x 10 <sup>9</sup>	4	4
E10	0,807	0,746	1,2 X 10 <sup>10</sup>	1,2	1,2
E11	0,800	0,730	2,8 X 10 <sup>10</sup>	2,8	2,8
E12	0,820	0,766	1,5 X 10 <sup>10</sup>	1,5	1,5
E13	0,832	0,763	1 X 10 <sup>10</sup>	1	0,1
E14	0,869	0,761	4,5 X 10 <sup>10</sup>	4,5	4,5
E15	0,821	0,752	2 X 10 <sup>9</sup>	0,2	0,2
E16	0,885	0,780	4 X 10 <sup>9</sup>	0,4	0,4
E17	0,881	0,749	8 X 10 <sup>10</sup>	8	8
E18	0,834	0,760	2 X 10 <sup>9</sup>	2	2
E19	0,873	0,754	1 X 10 <sup>10</sup>	0,1	0,1
E20	0,828	0,786	1 X 10 <sup>10</sup>	1	1
Média ± DP	-	-	-	2,53 ± 2,31 <sup>a</sup>	2,49 ± 2,35 <sup>a</sup>

E = ensaio; NR = não realizada; DP = desvio padrão



O LOD para os métodos estudados ficou estabelecido na faixa de 1 a 8 células bacterianas em 25mL de amostra, demonstrando que na alíquota estabelecida pela legislação brasileira (RDC 12/2001) é possível detectar, nas condições em que foi realizado o experimento, até 1 célula de *Salmonella* (BRASIL, 2001). Dados semelhantes foram obtidos pelo fabricante bioMérieux utilizando também o protocolo NordVal que comprovou uma detecção limite de 1 a 10 células para 25g de amostra.

Os ensaios 13, 15, 16 e 19 (Tabela 7) apresentaram valores <1 devido a constatação de resultados falso positivos (FP) (Tabela 8) justificando sua exclusão da faixa de detecção.

A análise estatística das médias dos ensaios através do teste T de Student ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ) demonstrou que o LOD das duas metodologias não diferem (Tabela 7). Isto comprova que os métodos rápido/prático (VIDAS) e o método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. são eficientes.

Foi observada desvantagem no uso da leitura espectrofotométrica para determinação da concentração bacteriana devido a inconstância apresentada como pode ser observado na Tabela 7. Neste recurso, a leitura representa a concentração de massa bacteriana não especificando a quantidade de células viáveis presente na amostra. Além disso, os gases presentes no inóculo da fase estacionária, resultantes do processo fermentativo e observados na parede da cubeta podem interferir na leitura espectrofotométrica devido à adesão das bolhas, impedindo assim a perfeita passagem do feixe de luz com conseqüente erro.

De acordo com os dados obtidos foi possível verificar que a leitura espectrofotométrica variou mesmo quando houve coincidência na contagem de células viáveis. Isto demonstra que o uso isolado da leitura espectrofotométrica como parâmetro de quantificação bacteriana não se mostra perfeitamente confiável. Quando se considera as condições normais disponíveis nos laboratórios de microbiologia, tal verificação nos leva a atribuir vantagem ao método por contagem em placas, uma vez que a introdução de leitura espectrofotométrica nas rotinas laboratoriais torna o processo oneroso pela necessidade do equipamento, o que inviabiliza a implantação do método. O recurso de contagem em placa para uso na determinação do limite mínimo de detecção, apesar de mais laborioso, é considerado viável, sobretudo pela maior facilidade de domínio da técnica pelos laboratoristas.

#### 5.4 Validação do método

Os dados obtidos nas análises para validação da proposta metodológica para determinação do LOD em diferentes concentrações de células viáveis se encontram na Tabela 8.

Tabela 8. Respostas positiva/negativa para detecção de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 em diferentes concentrações.

ENSAIO	BRANCO		<1UFC/mL		1 –10 UFC/mL		10 –100 UFC/mL	
	Vidas	Tradic.	Vidas	Tradic.	Vidas	Tradic.	Vidas	Tradic.
E1	-	-	-	-	+	+	+	+
E2	-	-	-	-	+	+	+	+
E3	-	-	-	-	+	+	+	+
E4	-	-	-	-	+	+	+	+
E5	-	-	-	-	+	+	+	+
E6	-	-	-	-	+	+	+	+
E7	-	-	-	-	+	+	+	+
E8	-	-	-	-	+	+	+	+
E9	-	-	-	-	+	+	+	+
E10	-	-	-	-	+	+	+	+
E11	-	-	-	-	+	+	+	+
E12	-	-	-	-	+	+	+	+
E13	-	-	-	+	+	+	+	+
E14	-	-	-	-	+	+	+	+
E15	-	-	+	+	+	+	+	+
E16	-	-	+	+	+	+	+	+
E17	-	-	-	-	+	+	+	+
E18	-	-	-	-	+	+	+	+
E19	-	-	+	+	+	+	+	+
E20	-	-	-	-	+	+	+	+

E = ensaio; Vidas = método AOAC 996..08; Tradic. = método AOAC 967.26.

Apesar de estar estabelecido no protocolo NordVal que sejam testadas apenas amostras com concentração de células entre 1–10UFC/mL, 10-100UFC/mL e amostra não contaminada (branco) foi realizada também inoculação de amostras com concentração <1UFC/mL por considerar que o experimento trata da detecção da menor concentração de um analito por um método e na qual não foi possível obter resultados satisfatórios (Tabela 8). Outros pesquisadores também utilizaram esta estratégia para avaliar a taxa de recuperação de meios de cultura de enriquecimento para detecção de *Salmonella* spp. pelo método imunoenzimático (HUANG et al., 1999).

As fórmulas aplicadas para estabelecer a precisão e a sensibilidade do método de LOD encontram-se descritas no anexo III.

Tabela 9. Precisão e sensibilidade da proposta metodológica para determinação do LOD de métodos de análise de *Salmonella* spp.

Método	PA	NA	FN	FP	N	Precisão	Sensibilidade
LOD VIDAS	40	37	0	3	80	96,25%	100%
LOD TRADICIONAL	40	36	0	4	80	95,00%	100%

PA- amostra positiva; NA- amostra negativa; FN- falso negativo; FP- falso positivo; N – total de amostras.

O número de resultados falso positivos (FP) (Tabela 9) justifica os valores inferiores encontrados para a precisão. Estes surgiram provavelmente pelas sucessivas etapas de diluição e homogeneização. Os resultados de FP para ambos os métodos, confirmaram relatos de Baranyi et al. (1993) quando ressaltaram que em pesquisas nas quais se utilizam material biológico podem ocorrer resultados FP em diluições limites, uma vez que quanto maior a diluição, maior a probabilidade de ocorrer esse tipo de erro.

Segundo Trabulsi et al. (2004) diluições seriadas são usadas para possibilitar a contagem de microrganismos no material contaminado quando há necessidade de diluir até um ponto em que a amostra quando semeada em meio apropriado, não apresente crescimento. Por considerar que os microrganismos são distribuídos ao acaso nas amostras diluídas, e que qualquer microrganismo viável presente nestas amostras irá crescer no meio, a densidade populacional original será estimada pela aplicação da teoria das probabilidades. A precisão do método é diretamente dependente do número de repetições por diluição, pois permanece baixa, mesmo que o número de amostras seja grande.

Diante do exposto, foi possível observar que a metodologia de limite mínimo de detecção proposta pode ser aplicada na rotina laboratorial visando atender as exigências da creditação laboratorial, bem como assegurar maior confiabilidade nos resultados dos ensaios microbiológicos produzidos.

## Conclusões

---

---

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições utilizadas nos experimentos permitem concluir.

- A leitura espectrofotométrica para estabelecimento da concentração de células bacterianas apresenta inconstância além de não corresponder a contagem em placa.
- O modelo matemático quadrático foi eficaz no ajuste dos dados experimentais da curva de crescimento de *Salmonella typhimurium*, além de demonstrar maior simplicidade e praticidade na sua aplicação.
- O método proposto para determinação do LOD para análise de *Salmonella* spp. em alimentos foi considerado eficaz e eficiente.

## Referências bibliográficas

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, C. R. M. Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401 – 408, 2003.

ANDERSON, D. J. Determination of the lower limit of detection. **Clinical Chemistry**. v. 35, n. 10, 1989.

AQUINO, J. S.; VASCONCELOS, J. C.; SILVA, M. S. B. Ocorrência de bactérias do gênero *Salmonella* em carne moída comercializada na cidade de Manaus (AM). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v. 10, n. 2, p. 194 – 200, 1992.

ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/ limit of quantitation (LOQ): Comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, 40;7, p.1233 – 1238, 1994.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17<sup>th</sup> ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v.1. 2002.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). **United States Food and Drug Administration and Association of Official Analytical Chemists International**. 7<sup>th</sup> ed. Arlington. 1992. 529p.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; McCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**. v. 10, p. 43 – 59, 1993.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**. v. 26, p. 199 – 218, 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

BASTIS, A. A.; RAZAVILAR, V. Growth response and modeling of the effects of selected factors on the time-to-detection and probability of growth initiation of *Salmonella typhimurium*. **Food Microbiology**. v. 21, p. 431 – 438, 2004.

BEUMER, R. R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F. M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 363 – 374, 1991.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p.119 – 130, 1999.

BRASIL. **Resolução ANVISA/MS nº 12 de Janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Bactéria é considerada uma das principais causas de infecção alimentar. 17/09/2004**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/saude/>>. Acesso em: 06 novembro 2005.

CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1/2, p. 15 – 19, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 10 outubro 2005.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). **Surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE, estado de São Paulo, 1995**. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/DTA\\_TAB195.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/DTA_TAB195.htm)>. Acesso em: 06 novembro 2005.

COGAN, T. A.; DOMINGUE, G.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; BENSON, C. E.; WOODWARD, M. J.; HUMPHREY, T. J. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. **International Journal of Food Microbiology**. v. 70, p. 131 – 141, 2001.

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

COX, C. Limits of quantitation of laboratory assays. **Appl. Statist.** v. 54. part 1. p. 63 – 76, 2005.

CURTIS, G.D.W.; BEUCHAT, L. R. Quality control of culture media – perspectives and problems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 45. p. 3 – 6, 1998.



DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F. M.; DUARTE, L. F.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V. P. Microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouros de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 79 – 85, 2005.

EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M.; BASSIT, N. P. Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no estado de São Paulo – 1999-2000,. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 60 – 61, 2003.

FLORENTINO, E. R.; LEITE JÚNIOR, A. F.; SÁ, S. N.; ARAÚJO, M. S. O.; MARTINS, R. S. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída comercializada em Campina Grande, PB. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 38 – 41, 1997.

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

FORTUNA, J. L.; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 33 – 44, 2005.

FRANCO, B. D. G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 33, n.2, p.229 – 234, jul/dez. 1999.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Ateneu, 2004. 182p.

GILL, N.; REILLY, B.; SMITH, H. **International surveillance network for the enteric infections – *Salmonella* and VTEC O157**. European Commission – DG SANCO, agreement n. SI2.326441, 2002.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: Um problema técnico bastante complexo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.68/69, v.14, jan/fev. p.58 – 61, 2000.

GIOMBELLI, A.; LOPES DA SILVA, N. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes in natura. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16. n. 95, abr. p. 88 – 91, 2002.

GRIJSPEERDTI, K.; VANROLLEGHEM, P. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. **Food Microbiology**. v. 16. p. 593 – 605, 1999.

GUPTA, R.; SHARMA, P.; VYAS, V.V. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, n. 41, p.29 – 37, 1995.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecção e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 376p.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. 789p.

HUANG, H.; GARCIA, M. M.; BROOKS, B. W.; NIELSEN, K.; NG, S. Evaluation of culture enrichment procedures for use with *Salmonella* detection immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**. v. 51. p. 85 – 94, 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in foods safety management**, 1<sup>a</sup> ed., Zaragoza: Editora Acribia, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 edición. São Paulo: Editora Panamericana, 1999. 1432p.

LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por Enteropatógenos. **Revista Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 1, n. 17, p. 77 – 113, 1996.

LAWSON, G.M. Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 453 – 454, jan 1994.

LIGHTFOOT, N. F.; MAIER, E. A. **Análise microbiológica de alimentos e água – Guia para a garantia da qualidade**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 279p.

LINNET, K.; KONDRATOVICH, M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. **Clinical Chemistry**. v. 50. n. 4, 2004.

LÓPEZ, S.; PIETRO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; FRANCE, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96, p. 289 – 300, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA (MAARA). **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. 2ª revisão, 1991/1992.

NASCIMENTO, M. S.; BERCHIERI Jr, A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 85 – 91, 2000.

NORDVAL. **Protocol for the validation of alternative microbiological methods**. Department of Microbial Food Safety – Denmark. Disponível em: <<http://www.nmkl.org/NordVal/NordVal.htm>>. Acesso em: 15 dezembro 2005.

PENA, E.; LEOCÁDIO FILHO, G.; DIAS, R.S. **Surto de toxinfecção alimentar com registro de óbito envolvendo *Salmonella* spp.** – um estudo de caso. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte, MG, 2000.

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

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2v. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 524p.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B.D.G.M.. Produção de imunorreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21 (3): 261 – 226, set-dez. 2001.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B.D.G.M.. Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 22 (2): 105 – 110, maio-ago. 2002.

RIPP, J. **Analytical detection limit guidance & Laboratory guide for determining method detection limits.** Publ-TS-056-96. April 1996. Disponível em: <<http://www.dnr.state.wi.us/org/es/science/lc/OUTREACH/Publications/LOD%20Guidance%20Document.pdf>>. Acesso em: 26 setembro 2005.

SCHLEGEL, H. G. **General microbiology.** 7<sup>th</sup>. United Kingdom: University Press - Cambridge, 1997. 655p.

SILVA, J.A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 2000. 227p.

SILVA Jr., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos.** 5<sup>a</sup> edição. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 479p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo, 1997.

SOUZA, J.M.; CARDOSO, L.D.F.; OLIVEIRA, J.V.; SILVA, S.O. **Levantamento de surtos de toxinfecções alimentares em bolos confeitados, tortas e pavês consumidos em Belo Horizonte.** XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte, MG, 2000.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (SMWW) - American Public Health Association (APHA). 18<sup>th</sup> ed., Washington, DC: American Public Health Association and American Water Works Association Water Environment Federation. 1992.

STATSOFT, Inc. STATISTICA for Windows 6.0 [Computer program manual]. Tulsa: StatiSoft, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B.; COMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia.** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2004. 718p.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 10 outubro 2005.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**. v. 100, p. 97 – 105, 2005.

VIEIRA, S. **Bio Estatística: Tópicos Avançados**. Rio de Janeiro, 2 ed. Elsevier, 2004. 216p.

WASTGARD, J. O. **Method validation – The detection limit experiment**. 2000. Disponível em: <<http://www.westgarg.com/lesson29.htm>>. Acesso em: 19 maio 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Drug-resistant *Salmonella***. WHO, n. 139, 2005. Disponível em: <<http://who.org>>. Acesso em: 10 outubro 2005.

Anexos



## ANEXO I

### PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS

#### 1. Princípio

Avaliar a susceptibilidade do meio para colonização do microrganismo desejado, assim como a resistência à colonização por cepas interferentes.

#### 2. Documento de Referência

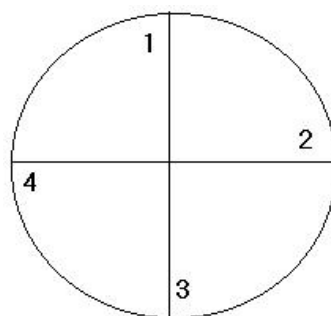
- Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Segundo a revisão. 1991-1992.

#### 3. Procedimento prévio

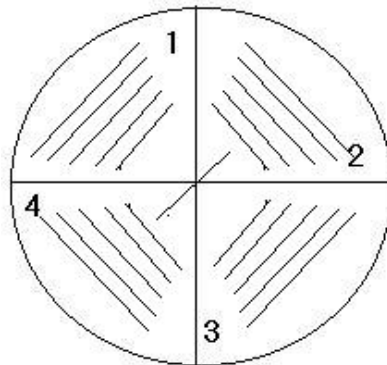
Avaliar o aspecto do meio quanto à sua coloração e umidade.

##### 3.1. Técnica

- Tomar uma cultura fresca em fase estacionária (18h a 30° C) de uma cepa específica para o meio em teste, que tenha sido semeada em caldo BHI, APA ou caldo nutriente.
- Tomar uma cultura fresca em fase estacionária (18h a 30° C) de uma cepa não específica para o meio em teste.
- Adequar o tempo e a temperatura de acordo com as cepas.
- Preparar quatro placas de petri com o meio em teste. A espessura do meio deve ser  $\geq 4$  mm.
- Secar as placas invertidas em estufas a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  por cerca de uma hora.
- Marcar as placas, dividindo-as em quatro quadrantes.



- Partindo da cultura pura (item a) e usando alça calibrada de 1 $\mu$ L, traçar 5 estrias em cada quadrante da placa partindo do primeiro quadrante e finalizando com uma estria central de forma progressiva sem recarregar, nem flambar a alça. Utilizar duas placas com o meio que se deseja validar.
- Repetir o procedimento usando a cultura não específica (item b) para o meio em teste.



i) Incubar as placas por tempo e temperatura especificados para as culturas.

#### **4. Cálculo do índice do crescimento absoluto (ICA)**

- Para cada estria em que ocorrer crescimento da cepa, atribui-se o valor 0,2.
- O crescimento completo da cepa nos quatro quadrantes e estria central terá ICA = 5.
- Quando aproximadamente metade das estrias de um quadrante mostrarem crescimento, o ICA será o nº do quadrante - 0,5.
- Calcular o ICA total pela soma dos resultados individuais de cada quadrante.

#### **5. Interpretação dos resultados**

##### **5.1 Avaliação quanto a seletividade**

O ICA  $\geq 3$  para cepas desejadas e ICA  $\leq 2$  para cepas não desejadas em meio seletivo.

##### **5.2 Avaliação quanto a produtividade**

Para o meio de cultura não seletivo, o ICA deve ser  $\geq 3,5$  em todas as cepas utilizadas.



## ANEXO II

### TESTE DE SELETIVIDADE E PRODUTIVIDADE PARA MEIOS LÍQUIDOS SELETIVOS E NÃO SELETIVOS

#### 1. Princípio

Consiste em avaliar a taxa de crescimento em meios de cultura líquidos seletivos e não seletivos.

#### 2. Documento de Referência

- Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Segundo a revisão. 1991-1992.

#### 3. Procedimento prévio

Avaliar o aspecto do meio quanto à sua coloração e umidade.

##### 3.1 Técnica

- a) Distribuir 10mL do caldo de referência e do caldo em teste em tubos com tampa de rosca. Autoclavar segundo as especificações do fabricante;
- b) Preparar cultura em fase estacionária dos microrganismos teste, homogeneizar e fazer diluições em solução salina até concentração aproximada de  $10^{-9}$  UFC/mL;
- c) Semear os caldos em duplicata, com 0,1mL do cultivo de cada microrganismo em estudo, que contenha aproximadamente  $10^5$  UFC/mL;
- d) Retirar 0,1mL do caldo em teste e transferir para uma placa de Petri contendo agar não seletivo com superfície seca. Espalhar com auxílio de alça Drigausky. Repetir o procedimento utilizando outra placa de Petri semeando 0,1mL do caldo de referência;
- e) Incubar os caldos e as placas de Petri sob condições específicas para os meios e microrganismos em estudo;

#### 4. Interpretação dos resultados

Os resultados podem ser avaliados visualmente pela turvação do meio de cultura e também pela presença de crescimento microbiano na placa.

## ANEXO III

### MODELO PARA ESTABELECIMENTO DA PRECISÃO E DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

#### 1. Documento de Referência

- NORDVAL. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. Department of Microbial Food Safety – Denmark

#### 2. Precisão

$$\text{Precisão\%} = \frac{PA + NA}{PA + NA + FN + FP} \times 100$$

onde:

PA – amostra positiva

NA – amostra negativa

FN – falso negativo

FP – falso positivo

#### 3. Sensibilidade

$$\text{Sensibilidade\%} = \frac{PA}{PA + FN} \times 100$$

#### 4. Interpretação dos resultados

Para estudo da sensibilidade do método apenas os valores acima de 95% são considerados aceitáveis.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)