

CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA

**PREPARO E AVALIAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA
PARA ANÁLISE DE *Salmonella***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586p
2008

Silva, Carolina dos Santos Fernandes da, 1982-
Preparo e avaliação de material de referência para
análise de *Salmonella* / Carolina dos Santos Fernandes
da Silva. – Viçosa, MG, 2008.
xiv, 107f.: il. ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella*. 2. Alimentos - Microbiologia.
3. Estudos de viabilidade. 4. Leite - Contaminação.
5. Laboratórios microbiológicos - Controle de qualidade.
6. Reação em cadeia de polimerase. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 576

CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA

**PREPARO E AVALIAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA
PARA ANÁLISE DE *Salmonella***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 18 de Junho de 2008

Prof^ª. Míriam Teresinha dos Santos
(co-orientadora)

Dr^ª. Virgínia Maria Chaves Alves
(co-orientadora)

Dr^ª. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^º. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de realizar o mestrado nesta instituição, pelo suporte teórico que me foi concedido e pela excelente infra-estrutura disponível para realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela dedicação, carinho, compreensão, confiança e pelo enorme conhecimento compartilhado.

À professora Míriam Teresinha dos Santos pelo carinho, sugestões e por sua amizade.

À doutora Virgínia Maria Chaves Alves pelas informações técnicas e conselhos.

À professora Célia Alencar de Moraes pelas conversas esclarecedoras sobre o programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao professor Maurício Dutra Costa pelas dicas e paciência durante o acompanhamento do estágio em ensino. Ao técnico Pablo, pelo auxílio.

Aos meus pais (*in memoriam*), Damilson e Eliete, pela educação e amor infinito.

Às duas mulheres da minha vida, Vó Janete e Tia Maguinha, pelo enorme amor, amizade, apoio, confiança, compreensão, e também pelos “puxões de orelha” quando necessários.

Ao meu querido Tio Danival pelo carinho, dedicação e exemplo de vida. E ao meu avô José Daniel pelo apoio.

Ao meu namorado Anderson pelo incentivo constante, companheirismo, compreensão, amizade e amor.

Aos meus demais familiares pelo carinho e apoio nos momentos de desânimo, em especial Tia Rita, Tio Adálvaro, Paula, Gláucia, Renata e vó Magna.

Às amigas Vanessa e Manuella pela amizade de tantos anos, pela motivação e força. Ao amigo Rondinelli pelo apoio.

À amiga Flávia Bonizol pela amizade verdadeira, companheirismo e incentivo durante a realização do mestrado na cidade de Viçosa.

Às amigas Sinara e Cibele pela amizade e carinho.

Aos amigos Leandro e Livia pelo carinho e pela consideração.

Ao amigo Juarez por todo ensinamento e por sua amizade.

Ao Edmar pelo auxílio constante, carinho e compreensão.

Aos meus colegas de trabalho dos Laboratórios de Patógenos e Alimentos pelo carinho, paciência, motivação e ajuda: Dri Ponce, Dri Santos, Gardênia, Evandro, Emilene e Renata. Em especial à Wanessa e Simone pela amizade, cumplicidade, bom humor e responsabilidade nos experimentos. Valeu!

À turma do Laboratório de Anaeróbios pelo apoio e pelo vários momentos de descontração: Aline, Marcelo, Claudinha, Ana Andréa e Janaína. Especialmente a Aryádina pela amizade e pela companhia durante as noites no laboratório.

Aos colegas Mariana e Thiago pelo carinho e pelos jogos de peteca aos domingos. À Daniele Ferreira, pelo apoio.

À professora Daise Rossi da Universidade Federal de Uberlândia pela simpatia e pela ajuda nas análises de PCR automatizado.

Ao professor Eduardo Mizubuti do Departamento de Fitopatologia pela compreensão e ajuda nas análises estatísticas.

A professora Sylvia Franceschini do Departamento de Nutrição pela ajuda nas análises com o programa Epiinfo.

Aos pesquisadores do INCQS, CIENTEC e INMETRO pela parceria na realização deste trabalho.

Aos funcionários, colegas e professores do Departamento de Microbiologia pelo constante apoio.

A todos aqueles que acreditaram em mim, meu MUITO OBRIGADA!!!

"Quantas vezes nós pensamos em desistir, deixar de lado o ideal e os sonhos...
Quantas vezes batemos em retirada, com o coração amargurado pela injustiça...
Quantas vezes sentimos o peso da responsabilidade, sem ter com quem dividir...
Quantas vezes sentimos solidão mesmo cercado de pessoas...
Quantas vezes falamos, sem sermos notados...
Quantas vezes lutamos por uma causa perdida...
Quantas vezes voltamos para casa com a sensação de derrota...
Quanta vezes aquela lágrima teima em cair, justamente na hora em que precisamos
parecer fortes...
Quantas vezes pedimos a Deus um pouco de força, um pouco de luz...
E a gente insiste em seguir, porque temos uma missão...
SER FELIZ!"

(Autor desconhecido)

BIOGRAFIA

CAROLINA DOS SANTOS FERNANDES DA SILVA, filha de Damilson Fernandes da Silva e Eliete dos Santos Fernandes, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, em 28 de abril de 1982.

Em março de 2001 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Presidente Antônio Carlos, na cidade de Juiz de Fora- MG, tornando-se licenciada em dezembro de 2004.

No ano de 2005 fez algumas disciplinas, como estudante especial, nos Departamentos de Microbiologia e Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
BIOGRAFIA	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1- CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DE <i>Salmonella</i> EM ALIMENTOS.....	4
1.2- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> EM ALIMENTOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL.....	8
1.3- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> POR IMUNOANÁLISE.....	12
1.4- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	14
1.5- MATERIAL DE REFERÊNCIA.....	17
1.6- DISPONIBILIDADES DO MR NO MERCADO	19
1.7- PREPARO E AVALIAÇÃO DO MR	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

CAPÍTULO 2

PREPARO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE <i>Salmonella</i>	41
2.1- INTRODUÇÃO	42
2.2- MATERIAL E MÉTODOS	43
2.2.1- OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE <i>Salmonella</i> PARA O PREPARO DO MR	43
2.2.2- PRODUÇÃO DO MR	44
2.2.3- AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DO MR	47
2.2.4- ENSAIO DE PROFICIÊNCIA.....	48
2.2.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
2.3.1- HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DO MR	50
2.3.2- ENSAIO DE PROFICIÊNCIA.....	56
2.4- CONCLUSÕES	60
2.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> EM MATERIAL DE REFERÊNCIA	66
3.1- INTRODUÇÃO	67
3.2- MATERIAL E MÉTODOS	68
3.2.1- OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE <i>Salmonella</i> PARA PRODUÇÃO DO MR	68
3.2.2- PRODUÇÃO DO MR	69
3.2.3 - AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DO MR	72
3.2.4 - COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> NO MR	72
3.2.4.1 - METODOLOGIA CONVENCIONAL.....	72
3.2.4.2 - IMUNOANÁLISE	73
3.2.4.3 - REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	74

3.2.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.3.1- MATERIAL DE REFERÊNCIA COM NÚMERO BAIXO DE <i>Salmonella</i>	76
3.3.2- HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DO MR	76
3.3.3- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> NO MR PELO MÉTODO CONVENCIONAL	81
3.3.4- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> NO MR POR IMUNOANÁLISE	83
3.3.5- DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> NO MR POR PCR.....	83
3.3.6- COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i>	87
3.4 - CONCLUSÕES.....	93
3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

ANEXO

CAPÍTULO 2.....	101
------------------------	------------

LISTA DE ABREVIACOES

- AOAC- “Association of Official Agricultural Chemists”: Associação Oficial dos Químicos Analíticos
- BAM/ FDA- “Bacteriological Analytical Manual- US Food and Drug Administration”: Manual Analítico de Bacteriologia do Setor de Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA
- BG- gar Bismulto Sulfito
- BGS- gar Verde Brilhante Sulfa
- BHI- Caldo Infusão Cérebro e Coração
- BPLS- gar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
- CDC- “Center for Disease Control and Prevention”: Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos EUA
- CDTN- Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear de Minas Gerais
- CIENTEC- Fundação de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
- CL- Caldo Lactosado
- DM-LIA- gar Lisina Ferro duplamente modificado
- FEPAS- “The Food Examination Performance Assessment Scheme”: Esquema de Avaliação de Desempenho na Análise de Alimentos acreditado pelo serviço de creditação do Reino Unido
- FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz
- HE- gar Entérico de Hectoen

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO- Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRMM- “Institute for Reference Materials and Measurements”: Instituto de Materiais e
Medidas de Referência
ISO- “International Organization for Standardization”: Organização Internacional de
Padronização
LIA- Ágar Lisina
LPAC- Leite em Pó Altamente Contaminado
LPD- Leite em Pó Desnatado Estéril
MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
MKTTn- Caldo Tetrionato Müller-Kauffman
MLG/ FSIS- “Microbiology Laboratory Guidebook - Food Safety and Inspection
Services”: Guia de Microbiologia de Laboratório do Serviço de Inspeção e Proteção de
Alimentos do Departamento de Agricultura dos EUA
MR- Material de Referência
MRC- Material de Referência Certificado
PCA- Ágar Padrão para Contagem em placas
PCR- Reação em Cadeia de Polimerase
RV- Caldo Rappaport-Vassiliadis
RVS- Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja
SC- Caldo Selenito Cistina
SPT- Água Peptonada Tamponada ou Salina Peptonada Tamponada
TSI- Ágar Triplo Açúcares e Ferro
TT- Caldo Tetrionato
TTH- Caldo Tetrionato Hajna
UFC- Unidades Formadoras de Colônia
VB- Solução Aquosa de Verde Brilhante
VRBG- Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose
XLD- Ágar Xilose Lisina Desoxicolato
XLT4- Ágar Xilose Lisina Tergitol 4
σp- Desvio Padrão Alvo

RESUMO

SILVA, Carolina dos Santos Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2008. **Preparo e avaliação de material de referência para análise de *Salmonella*.**
Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Míriam Teresinha dos Santos e Virgínia Maria Chaves Alves.

A utilização de Material de Referência (MR) na análise microbiológica de alimentos aumentou em todo o mundo, principalmente com a implantação de programas de controle e gestão da qualidade em laboratórios. A necessidade de padronização de métodos de análise faz aumentar a demanda por este tipo de material que permite determinar a precisão e repetibilidade dos dados experimentais. Este estudo teve como objetivo preparar MRs microbiológicos para análises quantitativa e qualitativa de *Salmonella*, avaliar a homogeneidade e estabilidade ao longo do tempo de estocagem e comparar a sensibilidade dos métodos de detecção de *Salmonella*. O estudo foi conduzido em duas etapas, a primeira com MR contendo, aproximadamente, 10^3 UFC/ g de células de *Salmonella*, submetidas ou não a condições de estresse nutricional e estocadas, por até 240 dias, a -20 °C. A segunda etapa consistiu no preparo de MR contendo, aproximadamente, 10 UFC/ g para comparação da sensibilidade das metodologias de detecção de *Salmonella* em alimentos. A homogeneidade e a estabilidade do MR contendo, aproximadamente, 10^3 UFC/ g foram avaliadas por meio do teste estatístico de T1, análise de regressão linear e ensaio de proficiência, enquanto que o MR feito com baixo número de células de *Salmonella* foi avaliado pelo teste estatístico de T2 e por meio do programa Epiinfo do

Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos EUA (CDC) para avaliação dos métodos de detecção de *Salmonella* neste material. O teste estatístico de T1 para o MR preparado com 10^3 UFC/ g demonstrou valores superiores aos recomendados para este tipo de material, o que indicou a necessidade de realização de novos estudos para melhoria da resistência de *Salmonella* às condições de desidratação e de estocagem. No entanto, o mesmo material apresentou-se homogêneo no ensaio de proficiência realizado por três diferentes laboratórios, obtendo-se o valor de σ_p de até 25 % como recomendado pelo Esquema de Avaliação de Desempenho na Análise de Alimentos do Reino Unido (FEPAS). Na análise de regressão linear constatou-se não haver diferença significativa entre os MRs produzidos com e sem células estressadas, apesar de ter sido evidente a tendência de declínio do número de células de *Salmonella* no material feito sem células estressadas, após 240 dias de estocagem a -20 °C. Para o MR preparado com 10 UFC/ g, o teste estatístico de T2 evidenciou resultados aceitáveis, após 60 dias de estocagem a 4 °C. Porções de 1 g deste MR foram avaliadas por três metodologias analíticas que incluíram o método convencional, o método imunoenzimático VIDAS[®] e PCR automatizado, pelo sistema BAX. Os resultados foram concordantes em todas as amostras analisadas nos dois primeiros métodos, com índice de Kappa igual a 1. O método de PCR apresentou concordância em aproximadamente 95 % com a metodologia convencional, com índice de Kappa igual a 0,64. Resultados falso-negativos foram observados em 5 % das amostras analisadas, quando utilizado o método de PCR, no entanto, este resultado não compromete a sensibilidade da técnica. Neste trabalho foram destacadas as vantagens do uso de metodologias rápidas de detecção de *Salmonella* em alimentos, que oferecem além de maior rapidez e praticidade para obtenção dos resultados, sensibilidade semelhante ao método convencional recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

ABSTRACT

SILVA, Carolina dos Santos Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2008. **Preparation and evaluation of reference material for *Salmonella* analysis.** Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisor: Miriam Teresinha dos Santos and Virgínia Maria Chaves Alves.

The use of Reference Material (RM) in microbiological food analyses increased around the world, mainly with the introduction of quality control and management programs in laboratories. The necessity of the standardization of analysis methods makes the demand for this type of material increase which allows the determination of precision and repeatability of the experimental data. This study aimed to prepare microbiological RMs for quantitative and qualitative analyses of *Salmonella*, to evaluate the homogeneity and stability of the material during storage time and to compare the sensitivity of the *Salmonella* detection methods. The study was performed in two stages. The first with RM containing approximately 10^3 CFU/ g of *Salmonella* cells, submitted or not to starvation and storage conditions, up until 240 days, at -20 °C. The second stage consisted of the RM preparation containing approximately 10 CFU/ g for comparison of the methodology sensibility of *Salmonella* detection in food. The RM homogeneity and stability containing approximately 10^3 CFU/ g was evaluated through the T1 statistical test, analysis of linear regression and proficiency test, while the RM performed with a low number of *Salmonella* cells was evaluated by the T2 statistical test and by the Epiinfo program of the Center for

Disease Control (CDC) of the USA for the evaluation of the detection methods of *Salmonella* in this material. The T1 statistical test for the RM prepared with 10^3 CFU/ g demonstrated superior values to the recommended ones for this type of material, which indicated the necessity for new studies for the improvement of the *Salmonella* resistance to the dehydration and storage conditions. However, the same material presented itself homogeneous in the proficiency test performed by three different laboratories, when the σ value was obtained until 25 % as recommended by the Food Examination Performance Assessment Scheme (FEPAS) of the United Kingdom. In the linear regression analysis, no significant difference was noted between the RMs produced with and without stressed cells, in spite of the decline tendency of the number of *Salmonella* cells in the material made without stressed cells being obvious after 240 storage days at -20 °C. For the RM prepared with 10 CFU/ g, the T2 statistical test presented acceptable results, after 60 storage days at 4 °C. One gram servings of this RM were evaluated by three analytical methodologies which included the conventional method, the immunoanalytical method VIDAS[®] and automated PCR, by the BAX system. The results were consistent in all the analyzed samples in the first two methods, with a Kappa rate equal to 1. The PCR method presented an agreement in approximately 95 % to the conventional methodology, with a Kappa rate equal to 0.64. False-negative results were observed in 5% of the analyzed samples, when the PCR method was used. However, this result does not compromise the technique sensibility. This study demonstrated advantages of the quick methodology use of *Salmonella* detection in food, which offers, besides greater speed and practicality for getting results, similar sensitivity to the conventional method recommended by Brazil's Ministry of Agriculture.

INTRODUÇÃO GERAL

Materiais de referência são uma importante ferramenta para a determinação da qualidade de medição, sendo definidos como materiais ou substâncias que têm um ou mais valores de propriedades homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na validação de métodos, calibração e adequação de equipamentos, estimativa da incerteza de medição, treinamento de funcionários e na comparação de desempenho entre diferentes laboratórios, denominados de ensaios de proficiência.

O uso de material de referência (MR) na análise microbiológica de alimentos é crescente em todo o mundo, principalmente com a implantação de programas de controle e gestão da qualidade em laboratórios. A necessidade de padronização de métodos de análise aumentou a demanda por materiais de referência microbiológicos, os quais permitem determinar a precisão e repetibilidade dos dados experimentais.

A grande maioria dos materiais de referência microbiológicos certificados (MRCs) é produzida na Europa, mas em função do custo de importação somado às exigências legais para aquisição deste tipo de material, não são amplamente usados pelos laboratórios de microbiologia no Brasil.

Vários pontos devem ser considerados na produção de MRC como a escolha de matriz adequada, a forma de apresentação do material, o tipo de embalagem, a temperatura e condições de armazenamento, os ensaios de homogeneidade e estabilidade, os ensaios de proficiência, a estimativa da incerteza de medição e a certificação do lote.

Materiais de referência para análise microbiológica de alimentos, disponíveis comercialmente, são em sua maioria, apresentados na forma de cápsulas de gelatina

contendo no seu interior leite em pó contaminado artificialmente pelo microrganismo de interesse. No entanto, é relatado na literatura a dificuldade de dissolução das cápsulas durante o seu uso, o que indica a necessidade do desenvolvimento de formas alternativas de apresentação dos MRs.

Entre os critérios microbiológicos mundialmente adotados para a análise de alimentos encontra-se a detecção de *Salmonella* como procedimento de rotina. A presença deste patógeno em 25 g do alimento é interpretada como risco potencial e significa que o produto em questão está impróprio para o consumo. A análise de *Salmonella* em alimentos pode ser conduzida por método convencional, que apresenta maior complexidade analítica, requer maior tempo e experiência do analista. Alternativamente, métodos rápidos e precisos de detecção de *Salmonella* como a utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) e a imunoenálise são cada vez mais empregados pelos laboratórios de microbiologia de alimentos.

Considerando a necessidade atual de harmonização de técnicas de análise microbiológica de alimentos, o objetivo do presente trabalho foi o de estabelecer as etapas de preparo de material de referência desidratado, avaliar a homogeneidade e a estabilidade do material durante o período de estocagem e comparar a sensibilidade dos métodos de detecção de *Salmonella* no MR.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1.1- Caracterização e importância de *Salmonella* em alimentos

A presença de contaminantes de natureza biológica em alimentos é uma das principais preocupações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Estima-se que cerca de 1,8 milhões de pessoas morrem no mundo, por ano, exclusivamente em função da ingestão de bebidas e alimentos contaminados (CHADE, 2007). Dentre as bactérias frequentemente veiculadas por alimentos o gênero *Salmonella* destaca-se por causar febre tifóide, paratifóide e gastroenterites agudas e severas (TERRAGNO *et al.*, 2003; FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; SILVA *et al.*, 2007).

Salmonella é um bastonete Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* não esporogênico, anaeróbio facultativo e oxidase negativo. Células pertencentes aos mais de 2500 sorotipos não produzem acetilmetilcarbinol nem fenilalanina deaminase. Em geral são móveis, mas as espécies dos sorotipos Gallinarum e Pullorum, ao contrário, usualmente são imóveis. Reduzem nitrato a nitrito, com produção de ácido, resultando na prova bioquímica de vermelho de metila positiva. Normalmente produzem gás a partir da fermentação da glicose, mas células dos sorotipos Typhi e Gallinarum são negativas. A temperatura de crescimento varia entre 5 a 7 °C e 46 °C, e a temperatura ótima entre 35 °C e 43 °C. O pH de crescimento varia entre 3,8 e 9,5 com ótimo entre 7 e 7,5. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (POPOFF e LE MINOR, 2005).

O gênero *Salmonella* foi nomeado como tal em 1885 pelo patologista Salmon. A identificação em gênero não é difícil pelo fato de seus integrantes compartilharem características bioquímicas comuns e apresentarem alta similaridade genética. A taxonomia de *Salmonella* evoluiu ao longo do tempo e inicialmente era fundamentada na epidemiologia, gama de hospedeiros, manifestações clínicas, reações bioquímicas e padrões antigênicos de superfície. A nomenclatura tornou-se muito confusa, parcialmente porque as designações de espécies e sorotipos foram utilizadas sem distinção (YAN *et al.*, 2003).

Diferente dos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, análises moleculares demonstraram que os integrantes do gênero *Salmonella* eram de 85 % a 100 % geneticamente correlacionados (BRENER *et al.*, 1972; CROSA *et al.*, 1973). Em função dessa estreita relação genética, uma espécie única, *S. choleraesuis* foi proposta. Entretanto, o

nome da espécie causou confusão uma vez que *choleraesuis* era usada para designar o nome da espécie e do sorotipo. Além disso, o sorotipo Choleraesuis não era representativo da maioria dos sorotipos. Em 1999 foi discutida a implementação das idéias de Le Minor e colaboradores, que haviam sugerido o uso de *S. enterica* para substituir *S. choleraesuis* como única espécie. Esta proposta ainda não foi aceita pela Comissão Judicial do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática, entretanto, é amplamente utilizada pelo Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella* da Organização Mundial da Saúde, localizado no Instituto Pasteur em Paris e pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) em Atlanta, EUA (YAN *et al.*, 2003).

De acordo com o sistema atual de nomenclatura adotado pelo CDC com base nas propriedades de hibridização do DNA, o gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*; *S. enterica* subsp. *salamae*; *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae*; *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF e LE MINOR, 2005; SILVA *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que as subespécies são diferenciadas quanto às características antigênicas em 2.500 sorotipos, por exemplo *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium ou ainda os sorotipos Typhi, Enteritidis e Choleraesuis. Para abreviar as citações, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium é denominada de *Salmonella* sorotipo Typhimurium ou ainda *Salmonella* Typhimurium (BRENNER *et al.*, 2000). Os sorotipos pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome, em geral, relacionado a região geográfica onde o sorotipo foi primeiramente isolado. Os sorotipos pertencentes às outras subespécies são designados por sua fórmula antigênica, escrita em seguida ao nome da subespécie em questão. As fórmulas antigênicas para sorotipagem de *Salmonella* estão definidas no esquema de Kauffmann-White, de acordo com a expressão de antígenos de superfície, como a cápsula (antígeno “Vi”), a parede celular (antígeno “O”) e os flagelos (antígeno “H”) (POPOFF e LE MINOR, 2005; ANDREWS e BÄUMLER, 2005; SILVA *et al.*, 2007). Anteriormente, os sorotipos de *Salmonella* eram grafados em itálico. Contudo, segundo a Comissão Internacional de Sistemática de Procariotos, a designação dos sorotipos deve ser feita em letras romanas com a primeira letra em maiúscula e não em itálico. No entanto, vários autores utilizam o nome em itálico (TINDALL *et al.*, 2005).

Assim como o teste sorológico, a fagotipagem procura similaridades entre as bactérias. Ambas as técnicas são úteis em localizar a origem e o curso do surto de uma doença. Fagotipagem é um teste para determinar a quais fagos uma bactéria é suscetível (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Salmonella é o principal agente veiculado por alimentos que causa doença em várias partes do mundo (OMS, 2005) e também no Brasil (TAVECHIO *et al.*, 1996; PERESI *et al.*, 1998; EDUARDO *et al.*, 2003; SIQUEIRA, DODD e REES, 2003; GHILARDI, TAVECHIO e FERNANDES, 2006).

Uma ampla variedade de alimentos contaminados é associada à salmonelose, incluindo carne bovina crua, aves domésticas, ovos, leite e derivados, peixes, camarões, pernas de rã, fermentos, cocos, molhos e temperos para salada, misturas para bolo, sobremesas recheadas e cobertas com cremes, gelatina desidratada, manteiga de amendoim, cacau e chocolates (D'AOUST, 1994; WAN *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2003; FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; ANDREWS e BÄUMLER, 2005). A contaminação do alimento é associada ao controle inadequado de temperatura, a práticas de manipulação incorretas ou a contaminação cruzada (D'AOUST, 1994; FORSYTHE, 2005).

Salmonella multiplica-se no alimento até atingir a dose infecciosa que varia de 20 até 10⁶ células, de acordo com a idade e a saúde do paciente, com o alimento e ainda com o sorotipo (FORSYTHE, 2005; SILVA *et al.*, 2007). A infecção inicia-se pela passagem do patógeno no lúmen e penetração das suas células no epitélio do intestino delgado, onde multiplicam-se. A seguir a bactéria invade o íleo e até mesmo o cólon. A infecção propicia uma resposta inflamatória. O período de incubação antes do aparecimento dos sintomas é de, aproximadamente, 16 a 72 horas. A enfermidade é em geral, autolimitante e persiste durante dois dias a 7 dias. Os sintomas característicos da doença incluem diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios e algumas vezes vômito, dor de cabeça e fraqueza. O número de casos de salmonelose demonstra uma tendência sazonal definida, com picos de incidência no verão (SALYERS e WHITT, 1994; FORSYTHE, 2005; ANDREWS e BÄUMLER, 2005).

A importância clínica desta bactéria foi reconhecida muito tempo antes dos modernos métodos de especificação fundamentados na homologia de DNA (SALYERS e

WHITT, 1994). Estima-se que 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente são causadas por *S. enterica* subsp. *enterica* (BRENNER *et al.*, 2000).

Nos EUA são estimados, por ano, de seis milhões a 80 milhões de casos de enfermidades originadas a partir da ingestão de alimentos contaminados, com mais de 9.000 mortes por ano, sendo 1,5 milhões de casos de infecções por *Salmonella* não-tifóide (ANGULO *et al.*, 1998; MEAD *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2001; YAN *et al.*, 2003). Em países da América do Sul como Brasil, Chile, Argentina, Peru, Uruguai, Paraguai e Equador, foram relatados 406 surtos e 16.304 casos de salmonelose entre 1995 e 2001 (FRANCO *et al.*, 2003; BERSOT, 2006). Entre 1999 e 2003 foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo (CVE) 1.024 surtos de diarreia que envolveram 27.499 casos. Apenas 459 surtos tiveram a etiologia identificada, e destes, 70,8% foram causados por bactérias, sendo 43,1 % causados por ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* (EDUARDO *et al.*, 2003).

Dentre os sorotipos de *Salmonella* isolados de surtos de infecção alimentar, *S. Typhimurium* é considerado o mais importante, destacando-se aqueles resistentes a vários antibióticos, como é o caso de *S. Typhimurium* DT104 resistente a pelo menos cinco antibióticos (BESSER, GOLDOFT e PRITCHETT, 2000). No entanto, nas últimas décadas, ocorreu um aumento expressivo na prevalência de *S. Enteritidis* nos isolamentos a partir de espécimes clínicos e de alimentos (ALTEKRUSE, COHEN e SWERDLOW, 1997; BÄUMLER, HARGIS e TSOLIS, 2000).

S. Typhimurium é responsável por 40 % a 70 % de casos de salmoneloses em humanos (LEON-VELARDE *et al.*, 2004). Na Inglaterra cerca de 80 % dos fagotipos identificados em infecções humanas correspondem a *S. Typhimurium* DT104 e/ou *S. Enteritidis* PT4 (HUMPHREY *et al.*, 1998; MATTICK *et al.*, 2000; MATSUI *et al.*, 2001). Na Noruega, a porcentagem de casos de salmoneloses atribuídos a *S. Enteritidis* teve média anual de 51,4 % e de 18,2 % de *S. Typhimurium* (KAPPERUD, STENVIG e LASSEN, 1998). No Brasil, os surtos por *S. Enteritidis* são registrados com frequência na região de São Paulo desde 1993 e, parece estar associado ao intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa, em que este sorotipo é predominante (PERESI *et al.*, 1998). Nas últimas décadas, *S. Enteritidis* representava de 0,4 % a 1 % de todos os sorotipos isolados de infecções humanas, mas a partir de 1995, passou a ser predominante,

correspondendo a 64,9 % dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6 % de outras origens (TAVECHIO *et al.*, 1996). Nos Estados Unidos, dados epidemiológicos indicam que *S. Enteritidis* ocupou o nicho ecológico em aves após a erradicação de *S. Gallinarum* (BÄUMLER, HARGIS e TSOLIS, 2000). *Salmonella* Enteritidis é de origem aviária, sendo encontrada principalmente em ovos. A transmissão do microrganismo para os ovos pode ocorrer por duas vias: transmissão vertical transovariana e a transmissão horizontal pela casca. Na primeira via, *S. Enteritidis* é introduzida no ovo a partir de ovários e ovidutos infectados antes da postura (THIAGARAJAN, SAEED e ASEM, 1994). O microrganismo pode também, secundariamente, penetrar a casca de ovos por contaminação destas com fezes (COX, BERRANG e CASON, 2000). Nos Estados Unidos, 80 % dos surtos por *S. Enteritidis* foram associados ao consumo de ovos ou alimentos contendo ovos (CDC, 2004).

1.2- Detecção de *Salmonella* em alimentos pelo método convencional

A ausência de organismos infecciosos está entre as qualidades desejáveis dos alimentos. Contudo, alcançar níveis de “tolerância zero” de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores mesmo com a aplicação das boas práticas de fabricação pode não ser possível. Assim, o objetivo é a produção de alimentos com quantidades aceitáveis destes microrganismos que não causem danos à saúde do consumidor. Para alcançar este objetivo as indústrias de alimentos utilizam métodos clássicos de controle de qualidade, que estão fortemente fundamentados nos padrões microbiológicos das matérias-primas e dos produtos finais. Porém, de acordo com o método de análise, o tempo necessário para obtenção de resultados precisos é longo. O desenvolvimento e a utilização de métodos analíticos mais rápidos são de grande valia, contudo, esses métodos isoladamente não dispensam a necessidade de novos procedimentos que garantam maior confiabilidade da análise (JAY, 2005).

A inspeção de alimentos para verificar a presença de *Salmonella* é um procedimento de rotina no mundo (CORTEZ *et al.*, 2006). A presença de *Salmonella* é determinada em 25 gramas ou mililitros da amostra sob análise, sendo o resultado positivo para esta

pesquisa interpretado como risco potencial, o que significa impropriedade ao consumo do produto em questão (BRASIL, 2003).

A técnica convencional de detecção de *Salmonella* em alimentos é um método de cultivo clássico de presença/ ausência, desenvolvido com a finalidade de garantir sua detecção, mesmo em situações extremamente desfavoráveis. Esse é o caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella* e/ou alimentos em que as células de *Salmonella* encontram-se em número muito reduzido, ou ainda, em alimentos em que as células de *Salmonella* encontram-se injuriadas pelo processo de preservação como aplicação de calor, congelamento ou secagem (SILVA *et al.*, 2007).

Segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os métodos para isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos, usualmente, são divididos em cinco etapas sucessivas: pré-enriquecimento ou enriquecimento não-seletivo; enriquecimento seletivo; isolamento e seleção em meios sólidos seletivos e diferenciais; identificação bioquímica das colônias suspeitas; análise antigênica com anti-soro polivalente O (BRASIL, 2003).

O pré-enriquecimento em caldo não-seletivo tem como objetivo a recuperação de células injuriadas, e é conduzido incubando-se a amostra em condições não seletivas, por exemplo, em água peptonada tamponada, também denominada de salina peptonada 1% tamponada (SPT), ou em caldo lactosado (CL), com algumas exceções, por pelo menos 18 horas (SILVA *et al.*, 2007). A utilização de SPT, favorece a manutenção do pH e assim evita que a microbiota acompanhante acidifique o meio, e prejudique a recuperação das células de *Salmonella* (BRASIL, 2003). O CL pode ser usado como meio de pré-enriquecimento, pois quando a microbiota acompanhante utiliza a lactose, há uma redução no pH, o que gera efeito bacteriostático desta microbiota e favorece o isolamento de *Salmonella* (FLOWERS *et al.*, 1992).

O enriquecimento em caldos seletivos tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover o aumento preferencial do número de células de *Salmonella*. Nessa etapa, alíquotas da amostra pré-enriquecida são incubadas em caldo seletivo, por 18 horas a 24 horas. Recomenda-se a utilização de dois meios de enriquecimento, pois a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia de acordo com o sorotipo. Os meios, em geral recomendados são os caldos Rappaport-Vassiliadis

modificado (RV) ou Rappaport-Vassiliadis soja (RVS) e diversas formulações do caldo tetrionato (TT), com algumas exceções apresentadas na descrição dos procedimentos. A seletividade do RV e do RVS é associada à presença de oxalato de verde malaquita, na alta pressão osmótica, presença de cloreto de magnésio em alta concentração, e no pH relativamente baixo (5,1). O caldo TT tem várias formulações comerciais, que são utilizadas por diferentes órgãos reguladores. Essas formulações são bem definidas na descrição dos procedimentos. A base da seletividade do meio é a presença de verde brilhante, bile ou desoxicolato de sódio, iodo e tiosulfato de sódio. O iodo é adicionado no momento do uso, reagindo com o tiosulfato para formar o tetrionato. O crescimento de enterobactérias que reduzem o tetrionato, como *Salmonella*, é relativamente normal, enquanto bactérias do grupo coliforme e outras enterobactérias não redutoras são suprimidas. A redução do tetrionato leva a produção de ácido, neutralizado pelo carbonato de cálcio presente na formulação. Espécies do gênero *Proteus* também são redutoras de tetrionato e podem crescer nesse meio, interferência que pode ser reduzida com a adição de novobiocina (SILVA *et al.*, 2007). Outro meio utilizado é o caldo selenito cistina (SC) que tem como agente inibidor de bactérias do grupo coliformes e enterococos, o selenito de sódio (BRASIL, 2003).

O plaqueamento em meio seletivo e diferencial tem como objetivo promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica. Uma alçada de cada caldo seletivo é estriada no ágar seletivo e a confirmação de colônias típicas ocorre após 24 horas de incubação. Assim como na etapa de enriquecimento seletivo, recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um meio de cultura. Os meios mais usados são os meios que diferenciam *Salmonella* com base na capacidade de fermentar a lactose e de produzir H₂S, como o ágar entérico de Hectoen (HE), o ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e o ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4). Como há sorotipos de *Salmonella* que fermentam a lactose ou não produzem H₂S, é importante que o segundo ou terceiro meio de plaqueamento não seja fundamentado nessas duas características simultaneamente. Uma dessas opções é o uso do ágar verde brilhante (BG), que baseia-se na fermentação da lactose mas não na produção de H₂S, e o ágar bismuto sulfito (BS), que baseia-se na produção de H₂S mas não na fermentação da lactose (BRASIL, 2003; SILVA

et al., 2007). Ainda existe a recomendação de uso do ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS), que tem em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de bactérias Gram-positivas. Outro meio que pode ser usado nesta etapa é o ágar Rambach cuja diferenciação de *Salmonella* é promovida pela presença de propilenoglicol, e também de um cromógeno que evidencia a hidrólise de beta-galactosidade (BRASIL, 2003).

Colônias típicas selecionadas nos meios seletivos são repicadas em meio não seletivo, para confirmação da pureza das colônias e, após 24 horas de incubação, colônias isoladas são confirmadas por meio de provas bioquímicas e sorológicas. A confirmação bioquímica verifica o perfil bioquímico característico dos sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* após 24 horas. De maneira geral, os diferentes órgãos reguladores também recomendam o uso de “kits” comerciais miniaturizados, que permitem a realização de um número maior de provas bioquímicas. A confirmação sorológica verifica a presença de antígenos “O”, “Vi” e “H”, por testes de aglutinação com anti-soros polivalentes (SILVA *et al.*, 2007). O tempo gasto nesta etapa de confirmação bioquímica e sorológica totaliza 48 horas.

Os procedimentos recomendados por diferentes órgãos reguladores como a Organização Internacional de Padronização (ISO), o Manual Bacteriológico Analítico do Setor de Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA (BAM/ FDA) e o Laboratório Microbiológico do Serviço de Inspeção e Proteção de Alimentos do Departamento de Agricultura dos EUA (MLG/ FSIS), embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e forma de preparação das amostras, seguem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: enriquecimento não-seletivo, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e confirmação bioquímica e sorológica.

O método ISO 6579 (2007) recomenda as etapas de pré-enriquecimento em SPT; enriquecimento seletivo em RVS e caldo tetrionato Muller-Kauffman novobiocina (MKTTn) e plaqueamento diferencial em XLD e um segundo meio opcional (SILVA *et al.*, 2007).

Já o método BAM/ FDA recomenda as etapas de pré-enriquecimento em CL; enriquecimento seletivo em RV e TT e plaqueamento diferencial em HE, BS e XLD (ANDREWS e HAMMACK, 2007).

Segundo o método MLG/ FSIS (2004) o pré-enriquecimento deve ser em SPT; enriquecimento seletivo em RV ou RVS e caldo tetrionato Hajna (TTH); e plaqueamento diferencial em ágar verde brilhante sulfato (BGS), XLT4 ou ágar lisina ferro duplamente modificado (DM-LIA) (SILVA *et al.*, 2007).

A recomendação do MAPA é utilizar SPT no pré-enriquecimento; enriquecimento seletivo em RV ou RVS e SC e plaqueamento diferencial em BPLS e um segundo meio opcional (BRASIL, 2003).

O grande número de etapas necessárias na técnica convencional e o longo tempo para obtenção de resultados são os principais motivos para o desenvolvimento de novas técnicas para pesquisa de *Salmonella* em alimentos (HOORFAR, BAGGESEN e PORTING, 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002; SHINTANI, YAMADA e TORIMURA, 2002; RODRÍGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2003; RIYAZ-UL-HASSAN, VERMA e QAZI, 2004; MAZUMDAR *et al.*, 2007). Além disso, propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser sempre expressas, o que dificulta sua interpretação e classificação (MALORNY *et al.*, 2003; FREITAS, LEMOS e MARIN, 2006). Os objetivos principais das novas técnicas de detecção são a redução do tempo de análise, a simplificação do trabalho laboratorial e a redução do custo da análise. Muitas delas o aumento da precisão dos resultados como vantagem adicional (BLACKBURN, 1993; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002).

1.3- Detecção de *Salmonella* por imunoenálise

Nos últimos dez anos houve grande avanço no desenvolvimento de novos métodos de detecção de patógenos em alimentos, particularmente dos métodos imunológicos e, em menor escala, os métodos fundamentados em ácidos nucleicos. Esses métodos seguem a tendência atual de desenvolvimento de “kits” analíticos com marca registrada, definidos pela Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC) como: “sistemas contendo todos

os componentes-chave para a realização da análise de um ou mais microrganismos, em um ou mais tipos de alimentos, segundo um determinado método”. A grande vantagem dos “kits” é que todo o material requerido nos ensaios, ou parte dele, é comercializado em conjunto, eliminando as etapas de preparo de vidrarias e de reagentes (SILVA *et al.*, 2007).

Os imunoenaios enzimáticos (EIA) podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção de patógenos nos alimentos e no ambiente. A técnica de análise imunoenzimática é dependente da especificidade da reação antígeno-anticorpo e pode empregar tanto anticorpos monoclonais como anticorpos policlonais (REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002). Kits para detecção de microrganismos por imunoenálise podem ser encontrados comercialmente no sistema de reações imunoenzimáticas VIDAS[®], utilizado em substituição ou complementação à metodologia convencional (REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002; UYTENDAELE, VANWILDEMEERSCH e DEBEVERE, 2003)

O teste VIDAS[®] *Salmonella* (SLM) é um teste de imunoensaio automatizado para a detecção de salmonelas em produtos alimentares e em amostras ambientais. O sistema utiliza uma mistura de anticorpos monoclonais de captura de grande afinidade, dirigidos contra o antígeno “O” e antígeno “H”, que permite a detecção de sorotipos móveis e imóveis de *Salmonella* sp. O teste é qualitativo e permite a detecção de antígenos de *Salmonella* pela técnica de ensaio com enzima ligada à composto fluorescente (ELFA), que é derivada do ensaio imunoenzimático (ELISA) e apresenta como diferença o substrato metil-umbeliferil fosfato, responsável pela revelação (MANUAL, 2007).

Os resultados são obtidos em, aproximadamente, 45 minutos após o início do teste, sem considerar o processamento prévio das amostras, que consiste em ferver, por 15 minutos uma alíquota contendo um mililitro de cada caldo de enriquecimento seletivo utilizado no método convencional (MANUAL, 2007). A vantagem que o processamento prévio de cultivo proporciona, é o aumento da sensibilidade e a segurança de que as possíveis bactérias analisadas estejam viáveis, pois seu crescimento foi necessário no pré-enriquecimento e no enriquecimento seletivo.

O sistema VIDAS[®] de imunoensaio enzimático é reconhecido pela AOAC (AOAC, 2006) e pode ser utilizado no diagnóstico de diversos microrganismos e algumas toxinas, contudo sua utilização ainda é pouco relatada na literatura científica. Walker *et al.* (2001), compararam a detecção de *Salmonella* em tanques de leite e no leite cru empregando o

método convencional e o sistema VIDAS[®] e verificaram mais de 95,5 % de correlação entre os dois métodos. A comparação destas duas técnicas foi feita por De Médici *et al.* (1998), em amostras de carne de frango contaminadas com *Salmonella*; por Attrache *et al.* (1992) com amostras de produtos lácteos; e por Von Rückert (2006) que comparou o método microbiológico convencional, imunoanálise e PCR no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate.

1.4- Detecção de *Salmonella* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Até meados da década de 1980, as técnicas de biologia molecular estavam limitadas pela sensibilidade dos métodos de clonagem e detecção. Esses métodos tinham como princípio a marcação isotópica de sondas de DNA capazes de detectar quantidades ínfimas de uma dada seqüência-alvo, como fragmentos gênicos, por meio de experimentos de Southern blot e, mRNA, por meio de experimentos de Northern blot. Em 1985, um grupo de cientistas da Cetus Corporation padronizou uma técnica por meio da qual eram geradas, a partir do DNA genômico, grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, correspondendo a genes presentes como cópia única no genoma (SILVA-PEREIRA, 2003).

Essa nova e revolucionária metodologia, fundamentadas na reação de replicação *in vitro*, consiste em uma reação de polimerização em cadeia, na qual obtém-se o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial. A técnica de PCR é tão sensível que uma única molécula de DNA pode, em teoria, servir como molde para amplificação. Assim, um gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado a partir de DNA genômico complexo, podendo ser posteriormente visualizado como uma banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (JENIKOVÁ, PAZLAROVÁ e DEMNEROVÁ, 2000; SILVA-PEREIRA, 2003).

O método de PCR possui especificidade inerente, alta sensibilidade e rapidez para amplificação enzimática do DNA *in vitro* (WANG, LI e SLAVIK, 2002; MALORNY *et al.*, 2003; CASTAGNA *et al.*, 2005; FREITAS, LEMOS e MARIN, 2006; MYINT *et al.*, 2006), e é amplamente utilizado como método alternativo à metodologia convencional de

detecção de uma variedade de patógenos alimentares, incluindo *Salmonella* spp. (BEJ *et al.*, 1994; KWANG *et al.*, 1996; BENNETT *et al.*, 1998; COCOLIN *et al.*, 1998; STEFANOVICOVA *et al.*, 1998; WAAGE *et al.*, 1999; MACIOROWSKI *et al.*, 2000; WAN *et al.*, 2000; LAMPEL, ORLANDI e KORNEGAY, 2000; WHYTE *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; DE MÉDICI *et al.*, 2003; CORTEZ *et al.*, 2006).

A técnica inclui três etapas básicas, requeridas para a reação de síntese de qualquer DNA, que são repetidas por várias vezes, em ciclos: desnaturação térmica do DNA molde; anelamento dos oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde; polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP como substrato da reação de polimerização (FRANCO e LANDGRAF, 2003). O processo de amplificação inclui ciclos repetidos de desnaturação térmica do DNA molde, anelamentos dos iniciadores às suas seqüências complementares e extensão dos oligonucleotídeos anelados por uma DNA polimerase altamente resistente à desnaturação em altas temperaturas (*Taq* DNA polimerase) (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Os iniciadores anelam-se às fitas opostas da seqüência-alvo e são orientados de tal forma que a síntese de DNA ocorra por meio da região compreendida entre estes. Tem-se, então, a duplicação desse segmento de DNA, a cada ciclo de reação. Uma vez que os produtos recém-sintetizados também são complementares e capazes de se ligar aos iniciadores, após desnaturação térmica, cada ciclo sucessivo duplica a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. As amostras amplificadas são então coletadas para realizar a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, em paralelo a um controle positivo, um controle negativo e um marcador molecular de referência, para verificar o resultado da amplificação do segmento (SILVA-PEREIRA, 2003).

A técnica de PCR tornou-se uma importante ferramenta na identificação de microrganismos em amostras de alimentos, em amostras clínicas e ambientais (LAMPEL, ORLANDI e KORNEGAY, 2000; SCHRANK *et al.*, 2001; RIYAZ-UL-HASSAN, VERNA e QAZI, 2004). Entretanto, existem algumas variáveis que são consideradas como fatores negativos, como o alto custo do investimento tecnológico, impossibilidade de distinção de células vivas e células mortas, necessidade de aprovação oficial e regulamentos e instruções padronizadas (LI e MUSTAPHA, 2002; MALORNY *et al.*,

2003). Além disso, a maioria das técnicas de PCR ainda necessita de pré-enriquecimento para aumentar o número de microrganismos na amostra e processamento pós-amplificação, como o gel de eletroforese para determinar se a seqüência de DNA alvo está presente e se foi amplificada (WANG, LI e SLAVIK, 2002). Outro fator que deve ser considerado são as reações cruzadas que podem acontecer e que prejudicam a extração do DNA ou a eficiência da amplificação como, a composição complexa da matriz alimentar que inibe a reação de PCR e a interferência de metabólitos microbianos (WANG, CAO e CERNIGLIA, 1997; LI e MUSTAPHA, 2002). A ação de inibidores permanece obscura, sendo possível que eles atuem de forma a impedir a lise da célula, degradação ou ligação ao ácido nucléico ou inibição da DNA polimerase (LI e MUSTAPHA, 2002).

Vários métodos fundamentados na reação de PCR para detecção de *Salmonella* foram descritos e possuem como princípio a identificação de vários genes, como os determinantes patogênicos *invA* (STONE *et al.*, 1994), *spvA* (LAMPEL, KEASLER e HANES, 1996), *iroB* (BAUMLER, HEFFRON e REISSBRODT, 1997), o gene fimbrial *fimA* e *fimC* (COHEN *et al.*, 1996; DRAHOVSKÀ *et al.*, 2001) e *agfA* (DORAN *et al.*, 1996), genes que codificam para o rRNA (IIDA *et al.*, 1993) ou seqüências específicas do DNA de *Salmonella* que não tem função conhecida (AABO *et al.*, 1993).

Com a finalidade de remover substâncias inibidoras que interfiram na reação de PCR, alguns trabalhos utilizam a separação imunomagnética (IMS) como uma importante ferramenta, antes da extração do DNA bacteriano de amostras alimentares. A bactéria é especificamente separada dos espécimes, que resulta em uma amostra purificada para o PCR com pouco ou nenhum DNA não-específico ou fatores interferentes (RIJPENS *et al.*, 1999; JENIKOVÁ, PAZLAROVÁ e DEMNEROVÁ, 2000). Além desta estratégia, o diagnóstico por PCR em tempo real tem aumentado consideravelmente para detecção específica de patógenos de origem alimentar ao longo da cadeia produtiva (BENNETT *et al.*, 1998; HOORFAR, BAGGESEN e PORTING, 1999; WAN *et al.*, 2000; LIMING e BHAGWAT, 2004; MALORNY *et al.*, 2007). Esta técnica combina amplificação e detecção em uma única etapa de reação em tubo fechado (MALORNY *et al.*, 2007). A principal vantagem do PCR em tempo real é a alta sensibilidade, alta especificidade, excelente eficiência, reduzido tamanho do *amplicon* e etapas pós-PCR que reduzem o risco

de contaminação cruzada (RODRÍGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2003, BOHAYCHUK *et al.*, 2007).

Muitos microrganismos de importância em alimentos são estudados utilizando-se essas técnicas. É possível que, em futuro bem próximo, as etapas de enriquecimento indispensáveis à pesquisa de certos patógenos em alimentos possam ser abreviadas ou mesmo eliminadas (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

1.5- Material de Referência

Na rotina de um laboratório de análises são necessários padrões cujas propriedades apresentem valores próximos aos esperados e que se relacionem com as propriedades de interesse, em diferentes matrizes reais. Dentro dessa classe encontram-se os materiais de referência (MRs) (CHUI, IAMASHITA e BISPO, 2005).

Material de referência (MR) é definido pela norma ISO Guia 30: 1992 como “material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais”. Outro termo abordado pela norma é material de referência certificado (MRC), que se refere ao “material de referência acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade, na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor é acompanhado por uma incerteza para o nível de confiança estabelecido” (ISO guia 30: 1992; INMETRO, 2003).

A diferença entre o MR e o MRC é o grau de atribuições do material, o que implica em diferença no preço e na sua aplicação. Um MR é planejado para ser utilizado no controle de qualidade diário de análise laboratorial, e para este fim é uma importante ferramenta da qualidade. O MRC tem uso indicado para ocasiões específicas, como por exemplo, na validação de um método novo, ou para a comparação do desempenho entre laboratórios e técnicos (CORNELIS, 1992; JANNING *et al.*, 1995; MOOIJMAN e HAVELAAR, 1997).

A qualidade dos materiais de referência tem influência direta sobre a qualidade dos resultados analíticos gerados em laboratórios. Em geral, MRs são certificados por procedimentos especiais, sob supervisão de um órgão independente e competente. Quando métodos primários não estão disponíveis, são utilizados programas interlaboratoriais especialmente planejados para esse fim. A certificação de materiais de referência pressupõe oferecer ao usuário valores atribuídos às propriedades de interesse, que servirão de meios para conferir a rastreabilidade das medições geradas em processos metrológicos, que fazem parte dos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento e de controle de qualidade (CHUI, IAMASHITA e BISPO, 2005).

Inicialmente, a certificação de MR resumia-se, principalmente, a um processo de atribuição de valor ao material, sendo pouco enfatizadas as características de homogeneidade ou estabilidade (EUROPEAN COMMISSION, 1997; LINSINGER *et al.*, 2001). Observou-se então que os MRCs deveriam satisfazer a necessidades como representatividade de uso, homogeneidade específica com limites bem definidos e estabilidade durante período de tempo determinado (GRIEPINK, 1989 *apud* IN'T VELD, 1998). No entanto, ainda existem MRCs disponíveis no mercado que não atendem a parâmetros importantes de certificação, como a rastreabilidade (CAROLI *et al.*, 2000). Assim, nem todos os materiais que são usados como MR são descritos como tal. De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial- INMETRO, substâncias químicas de pureza variáveis e disponíveis comercialmente e produtos de programas de pesquisa são com frequência usados como padrões ou MR. E na falta de dados de certificação oferecidos pelo fornecedor, é responsabilidade do usuário avaliar as informações disponíveis e realizar a caracterização adicional conforme apropriado (INMETRO, 2005).

A rastreabilidade implica também em fornecer protocolo de utilização do MR que explique o procedimento correto de uso do material, o que permite reduzir variações de interpretação de resultados entre os laboratórios, e como consequência, aumentar a credibilidade da análise e evitar gastos com repetições desnecessárias. Por exemplo, considerando um número estimado de 250 milhões de análises químicas realizadas diariamente nos EUA, cerca de 10 % destas medições foram insatisfatórias e tiveram que ser repetidas, o que gerou custo adicional de 5 bilhões de dólares (HERTZ, 1988). Os erros

de medições, além do fator econômico, trazem também um amplo efeito social como o fechamento de fábricas, limitações no mercado de trabalho, desgaste administrativo, descarte de produtos e ações judiciais (MAIER, BOENKE e MÉRIGUET, 1997). Pode-se ressaltar ainda que, de acordo com a dificuldade de medição, podem ocorrer de 10 % a 50 % de resultados falso-positivos (MOOIJMAN *et al.*, 1992 *apud* VENELINOV e QUEVAUVILLER, 2003).

1.6- Disponibilidades do MR no mercado

No mercado estão disponíveis diferentes tipos de MRs usados para dar suporte a medições voltadas para composição química, biológica, clínica, física, propriedades de engenharia e outras áreas como na avaliação sensorial de alimentos e bebidas. São requeridos ainda para estimativa da incerteza de medição, na calibração e na adequação de equipamentos, reagentes e padrões. Eles podem ser caracterizados para “identidade” de um material, como por exemplo, a estrutura química, tipo de fibra, espécies microbiológicas, ou para “valores de propriedades”, como por exemplo, a quantidade de substância química específica e a dureza (INMETRO, 2005).

A utilização de MRs na análise microbiológica de alimentos é crescente em todo o mundo, principalmente com a implantação de programas de controle e gestão da qualidade em laboratórios. Na literatura consultada foram encontrados relatos do desenvolvimento, preparo e da certificação de MRs para análise qualitativa, com baixo número de UFC/ material, ou quantitativa, com número alto de UFC/ material, de *Salmonella* Typhimurium (BECKER *et al.*, 1985b; JANNING *et al.*, 1995; IN'T VELD *et al.*, 1996; SCHULTEN *et al.*, 2000); *Enterococcus faecium* (JANNING *et al.*, 1995; MOOIJMAN, DURING e NAGELKERKE, 2003); *Bacillus cereus* (JANNING *et al.*, 1995); *Clostridium perfringens* (MOOIJMAN, DURING e NAGELKERKE, 2003); *Pseudomonas aeruginosa* (MOOIJMAN, DURING e NAGELKERKE, 2003); *Escherichia coli* (MOOIJMAN, DURING e NAGELKERKE, 2003); *Enterobacter cloacae* (JANNING *et al.*, 1995) e *Listeria monocytogenes* (IN'T VELD, NOTERMANS e VAN DE BERG, 1995).

Entretanto, a disponibilidade desses MRs é restrita, pois segundo Jenks *et al.* (1998) e Jorhem (2004), o custo de importação somado aos aspectos legais para aquisição deste material ainda representa aspecto negativo que afeta a sua ampla utilização. De acordo com Cornelis *et al.* (2001) e Venelinov e Quevauviller (2003), desde a produção, certificação e estocagem de um MR, os custos podem exceder a 1,4 milhões de dólares por material, de acordo com o formato, peso, número de variáveis certificadas, número de técnicas usadas e tipo de condição de estocagem. Como consequência, o custo para o comprador também é alto. Segundo o IRMM (2007), a aquisição de um frasco contendo 10 cápsulas de MRC para análise de *Salmonella*, por exemplo, pode custar cerca de 160 dólares. Entretanto, a necessidade crescente de padronização de métodos de análise fez aumentar a demanda por este tipo de material.

Atualmente não existem MR de alimentos para todos os ensaios químicos, físicos e microbiológicos realizados pelos laboratórios de análise. Somente estão disponíveis MRs para as técnicas analíticas rotineiramente empregadas e para um número muito restrito de matrizes. Além disso, não há materiais de referência certificados de alimentos produzidos no Brasil, o que desperta o interesse do país em firmar-se no mercado nacional e internacional (ÁVILA *et al.*, 2003).

1.7- Preparo e avaliação do MR

Na preparação de um MR alguns pontos principais a serem considerados são: seleção do material, preparação, embalagem, armazenamento, ensaios de homogeneidade e estabilidade, estudos de certificação, estimativa da incerteza de medição, documentação, gestão da qualidade, aprovação da certificação, distribuição e revalidação (INMETRO, 2005).

A escolha de molde físico-químico apropriado para o MR, isto é, o formato escolhido para o material, deve ser fundamentado no propósito de evitar problemas associados com a homogeneidade e estabilidade deste material (LINSINGER *et al.*, 2001). MRs para análise microbiológica de alimentos são, na sua maioria, cápsulas de gelatina contendo leite em pó contaminado artificialmente pelo microrganismo de interesse.

Existem ainda materiais no formato de pastilhas, lenticulas, discos de gelatina e discos liofilizados (STAMP, 1947; MOOIJMAN *et al.*, 1992 *apud* VENELINOV e QUEVAUVILLER, 2003; CODD, RICHARDSON e ANDREWS, 1998; LIGHTFOOT, RICHARDSON e HARFORD, 2001; PHILIPP *et al.*, 2007). Para atender a demanda de órgãos de acreditação, laboratórios analíticos e aqueles que desenvolvem métodos de análise podem selecionar diferentes formatos de MRs para análise microbiológica. Os desafios para a produção de MRs mais resistentes estão em minimizar a interferência da matriz empregada e diminuir a variação entre as unidades (PHILIPP *et al.*, 2007).

Sabe-se que a água tem função relevante na estabilidade do material, e dependendo do método de preparo empregado, os resultados podem variar significativamente (RÜCKOLD, GROBECKER e ISENGARD, 2000, 2001; YAZGAN *et al.*, 2006). A variável atividade de água deve ser bem controlada para minimizar os efeitos de degradação por atividade enzimática e auto-oxidações.

No caso do MR microbiológico, outros fatores podem influenciar diretamente na estabilidade do material como o tipo de organismo teste, as condições do meio de cultura, a composição do meio para desidratação, a umidade relativa do laboratório e da matriz do material e as condições de estocagem (JANNING *et al.*, 1995). A escolha de temperatura apropriada para estocagem do MR foi investigada de forma criteriosa por Linsinger *et al.* (2001), com MR contendo 5 UFC/cápsula de *Salmonella* Typhimurium. Estes autores constataram que a temperatura de -20 °C foi suficiente para manter a estabilidade do material, por até 50 meses, enquanto que a temperatura de 30 °C resultou no decréscimo da viabilidade celular de 3 % ao dia (IN'T VELD *et al.*, 1996). Outro estudo com esse mesmo microrganismo comparou a estabilidade do MR nas temperaturas de 4 °C, 22 °C e 37 °C, com e sem adição de glicerol e sílica gel, por 120 dias e foi observado que na temperatura de 4 °C, com adição de sílica gel na embalagem houve maior estabilidade do MR (BECKER *et al.*, 1985b).

Vários trabalhos utilizaram MRs na análise comparativa de metodologias de detecção de microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos, como *S. Typhimurium* (IN'T VELD e NOTERMANS, 1992; IN'T VELD *et al.*, 1996; SCHULTEN *et al.*, 2000), *B. cereus* (IN'T VELD, HAVELAAR e VAN STRIJP-LOCKEFEEER, 1999),

E. coli (LIGHFOOT, RICHARDSON e HARFORD, 2001) e *L. monocytogenes* (IN'T VELD, NOTERMANS e VAN DE BERG, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D.; OLSEN J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, n. 3, p.171- 178, 1993.
- ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Foodborne Diseases**, v. 3, n. 3, p. 285- 293, 1997.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official method 2004.3 *Salmonella* in Foods. Enzyme-linked Fluorescent Assay (ELFA) Screening Method. In: **Official Methods of Analysis of AOAC international**, Maryland, USA, 18^a ed., cap. 17, p. 197- 199, 2005.
- ANDREWS, H.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella* species. In: FRATAMICO, P.; BHUNIA, A. K.; SMITH, J. L. **Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology**. Wyomondham, UK: Caister Academic Press, p. 327- 339, 2005.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Chapter 5- *Salmonella*, **Bacteriological Analytical Manual Online/ Food and Drug Administration - BAM/ FDA**, 2007. Disponível em: <<http://www.foodinonet.com/publication/fdaBAM.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2008.

ANGULO, F. J.; VOETSCH, A. C.; VUGIA, D.; HADLER, J. L.; FARLEY, M.; HEDBERG, C.; CIESLAK, P.; MORSE, D.; DWYER, D.; SWERDLOW, D. L. Determining the burden of human illness from food borne diseases: CDC's Emerging Infectious Disease Program Foodborne Disease Active Surveillance Network (FoodNet). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 14, p. 165- 172, 1998.

ATTRACHE, V.; CAVAND, M. C.; DUPUIS, C.; FILLON, P.; GRAVENS, C.; JOHNSON, R.; PRADEL, J. M.; RAYMOND, M.; RULE, P.; SAULINER, M.; MARCELAND, D.; HOAG, F. Automated ELISA detection of *Listeria* contamination using the VIDAS system. In: VASAVADA, P. Rapid methods and automation in dairy microbiology. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3101- 3113, 1993.

ÁVILA, A. K.; GEMAL, A. L.; GÓES, H. C. A.; OLIVERAS, L. Y.; BORGES, R. M. H.; FREITAS, S. C.; MARTINELLI, S.; CORRÊA, T. B. S.; SOUZA, V. **I Oficina sobre ensaios de proficiência e produção de materiais de referência no Brasil, em produtos relacionados às áreas de vigilância sanitária e ambiental, com ênfase em alimentos**, Rio de Janeiro: Fiocruz, dez. 2003.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1224- 1230, 1997.

BÄUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50- 61, 2000.

BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; ROBERTS, D.; PIETZSCH, O.; PRICE, T. H.; VAN SCHOTHORST, M.; TIPS, P. D.; VASSILIADIS, P.; KAMPELMACHER, E. H. Collaborative study on the isolation of *Salmonella* from artificially contaminated milk powder. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 35- 40, 1985a.

- BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; MEIJSEN, M. J. M.; KAMPELMACHER, E. H. Reference material for the evaluation of the standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 507- 512, 1985b.
- BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; BOYCE, M. J.; ATLAS, R. M. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p. 368- 373, 1994.
- BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437- 441, 1998.
- BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. **V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM**, Santa Maria, ago. 2006.
- BESSER, T. E.; GOLDOFT, M.; PRITCHETT, L. C. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 193- 200, 2000.
- BLACKBURN, C. W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 199- 214, 1993.
- BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; MCFALL, M. E.; KING, R. K.; RENTER, D. G. A real-time PCR assay for detection of *Salmonella* in a wide variety of food and Food-animal matrices. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1080- 1087, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, 26 ago. 2003. Manual de Métodos de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos

de Origem Animal e Água, Brasília D.F.: **Diário Oficial da União**, nº 181, seção 1, p. 14- 51, 2003.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; SKERMAN, F. J.; FALKOW, S. Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. **Journal of Bacteriology**, v. 109, p. 933- 965, 1972.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.7, p. 2465- 2467, 2000.

CAROLI, S.; FORTE, G.; ALESSANDRELLI, M.; CRESTI, R.; SPAGNOLI, M.; D'ILIO, S.; PAUWELS, J.; KRAMER, G.N. A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in honey. **Microchemical Journal**, v. 67, p. 227- 233, 2000.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Salmonella surveillance**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/SalmonellaIntroduction2004.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2006.

CHADE, J. Alimento contaminado causa 1,8 milhões de mortes por ano. **Jornal O Estado de São Paulo**, São Paulo, 16 nov. 2007. Disponível em: <<http://txt.estado.com.br/editorias/2007/11/11/ger-1.93.7.20071111.1.1.xml>>. Acesso em: 01 maio 2008.

CHUI, Q. S. H.; IAMASHITA, C. O.; BISPO, J. M. A. Estudo da homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 497- 501, 2005.

- COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Use of polimerase chain reation and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 673- 677, 1998.
- CODD, A. A.; RICHARDSON, I. R.; ANDREWS, N. Lenticules for the control of quantitative methods in food microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 913- 917, 1998.
- COHEN, H. J.; MECHANDA, S. M.; LIN, W. PCR amplification of thr *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4303- 4308, 1996.
- CORNELIS, R. Use of reference materials in trace element analysis of foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 307-313, 1992.
- CORNELIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O. F. X.; EBDON, L.; QUEVAUVILLER, P. H. Trends in certified reference material for the speciation of trace elements. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 370, n. 2-3, p.120-125, 2001.
- CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; IKUNO, A. A.; BURGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Veterinary Science**, v. 81, p.340- 344, 2006.
- COX, N. A.; BERRANG, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs: a review. **Poultry Science**, v. 79, n. 11, p. 1571- 1574, 2000.
- CROSA, J. H.; BRENNER, D. J.; EWING, W. H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. **Journal of Bacteriology**, v. 115, p. 307- 315, 1973.

- D'AOUST, J.-Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1-2, p.11- 31, 1994.
- DE MÉDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C.; CACIOLO, D.; FOSCHI, G.; OREFICE, L. Comparison between ICS-VIDAS, MSR/V and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 205- 210, 1998.
- DE MÉDICI, D.; CROCI, L.; DELIBATO, E.; PASQUALE, S. D.; FILETICI, E.; TOTI, L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with Sybr Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3456- 3461, 2003.
- DRAHOVSKÁ, H.; TURNA, J.; PIKNOVÁ, L.; KUČHTA, T.; SZITÁSOVÁ, I.; SKARKOVÁ, A.; SÁSIK, M. Detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. **Biologia Bratislava**, v. 56, p. 611- 616, 2001.
- EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M.; BASSIT, N. P.; DE MELLO, M. L. R. *Salmonella* Enteritidis- uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999- 2003. Disponível em <http://cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.html>. Acesso em: 30 jan. 2003.
- EUROPEAN COMMISSION: DG XII-5-C (SMT-PROGRAMME). **Guidelines for the production and certification of BCR reference materials** – Document BCR/01/97, Brussels: European Commission, 1997.
- FLOWERS, S.; D'AOUST, J.; ANDREWS, W. H.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, p. 388- 404, 1992.

- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução de Guimarães, M. C. M. e Leonhardt, C. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2005.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. S. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILIOTIS, M. D. e BIER, J. W. (eds). **International handbook of foodborne pathogens**. Marcel Dekker, p. 733- 743, 2003.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu, 2003
- FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073- 1083, 2006.
- GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 281- 286, 2006.
- GRIEPINK, B. (1989). Aiming at good accuracy with the community Bureau of Reference (BCR). In: IN'T VELD, P. H. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 35- 41, 1998.
- HERTZ, H. S. Are quality and productivity compatible in the analytical laboratory? **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 2, p.75 A- 80A, 1988.
- HOORFAR, J.; BAGGESEN, D. L.; PORTING, P. H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presuntive *Salmonella* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p.77- 84, 1999.
- HUMPHREY T. J.; WILLIAMS, A.; MCALPINE, K.; JØRGENSEN, F.; O'BYRNE, C. Pathogenicity in isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 which differ

- in RpoS expression: effects of growth phase and low temperature. **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 295- 301, 1998.
- IIDA, K.; ABE, A.; MATSUI, H.; DANBARA, H.; WAKAYAMA, S.; KAWAHARA, K. Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella* strains using combination of PCR and reverse dot-blot hybridization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, n. 2, p. 167- 172, 1993.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia - VIM**. Portaria Inmetro 029 de 1995, 3ª ed., Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 75p, 2003.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações para a seleção e uso de materiais de referência, DOQ- CGCRE- 016**, Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2005.
- IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. Use of reference materials (spray-dried milk artificially contaminated with *Salmonella typhimurium*) to validate detection methods for *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 11, p. 855- 858, 1992.
- IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. H. W.; VAN DE BERG, M. Potencial use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors: a collaborative study. **Food Microbiology**, v. 12, p. 125- 134, 1995.
- IN'T VELD, P. H.; VAN STRIJP-LOCKEFEEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MAIER, E. A. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p.496- 504, 1996.

- IN'T VELD, P. H. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 35- 41, 1998.
- IN'T VELD, P. H.; HAVELAAR, A. H.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 266- 274, 1999.
- IRMM. Institute for Reference Materials and Measurements. **CRM Price list 2007**. Disponível em <<http://irmm.jrc.ec.europa.eu>>. Acesso em: 02 maio 2007.
- ISO. **International Standard Organization**. Guide 30 - Terms and definitions used in connection with reference materials, Switzerland: International Standard Organization, 1992.
- JANNING, B.; IN'T VELD, P. H.; MOOIJMAN, K. A.; HAVELAAR, A. H. Development, production and certification of microbiological reference material. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240- 245, 1995.
- JAY, J. M., **Microbiologia de alimentos**. 6^a ed, São Paulo: Artmed, 2005.
- JENIKOVÁ, G.; PAZLAROVÁ, J.; DEMNEROVÁ, K. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. **International Microbiology**, v. 3, p. 225- 229, 2000.
- JENKS, P. J.; BOEKHOLT, A. H.; MAASKANT, J. F. N.; RUCINSKI, R. D. Are certified reference materials a victim of quality systems? The need for working matrix-certified reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, n. 3-4, p. 366- 369, 1998.

- JORHEM, L. Certified reference materials as a quality tool in food control: much used, often misused, sometimes abused. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, p. 305- 310, 2004.
- KAPPERUD, G.; STENVIG, H.; LASSEN, J. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 8, p. 774-782, 1998.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, Washington DC: American Public Health Association- APHA, 4^a ed., 2001.
- KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 46- 51, 1996.
- LAMPEL, K. A.; KEASLER, S. P.; HANES, D. E. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 137- 145, 1996.
- LAMPEL, K. A.; ORLANDI, P. A.; KORNEGAY, L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4539- 4542, 2000.
- LEON- VELARDE, C. G.; CAI, H. Y.; LARKIN, C.; BELL- ROGERS, P.; STEVENS, R. W. C.; ODUMERU, J. A. Evaluation of methods for the identification of *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium DT104 de amostras do ambiente de frangos. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p.79- 86, 2004.

- LI, Y.; MUSTAPHA, A. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 508- 512, 2002.
- LIGHTFOOT, N. F.; RICHARDSON, I. R.; HARFORD, J. P. The use of lenticules™ for the process control of enumeration techniques in food and environmental microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 660- 667, 2001.
- LIMING, S. H.; BHAGWAT, A. A. Application of a molecular beacon real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 177- 187, 2004.
- LINSINGER, T. P. J.; PUWELS, J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p.20- 25, 2001.
- MACIOROWSKI, K. G.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Efficacy of a commercial polymerase chain reaction based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 710- 718, 2000.
- MAIER, E. A.; BOENKE, A.; MÉRIGUET, P. Importance of the certified reference materials programmes for the European Union. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 496- 503, 1997.
- MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOOFFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p.39- 48, 2003.
- MALORNY, B.; MÄDE, D.; TEUFEL, P.; BERGHOF-JÄGER, C.; HUBER, I.; ANDERSON, A.; HELMUTH, R. Multicenter validation study of two blockcycler-

and one capillary-based real-time PCR methods for detection of *Salmonella* in milk powder. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 211- 218, 2007.

MANUAL do kit VIDAS[®]: ref. 30 702, Marcy-l'Etoile: BIOLAB- MÉRIEUX, 2007.

MATTICK, K. L.; JØRGENSEN, F.; LEGAN, J. D.; COLE, M. B.; PORTER, J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; Humphrey, T. J. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 at low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p.1274- 1279, 2000.

MATSUI, T.; MATSUDA, M.; MURAYAMA, O.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. recA genotyping of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates by restriction fragment length polymorphism analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 424- 427, 2001.

MAZUMDAR, S. D.; HARTMANN, M.; KÄMPFER, P.; KEUSGEN, M. Rapid method for detection of *Salmonella* in milk by surface plasmon resonance (SPR). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2040- 2046, 2007.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607- 625, 1999.

MOOIJMAN, K. A.; HAVELAAR, A. H. Application of microbiological (certified) reference materials. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 11-12, p. 467-470, 1997.

MOOIJMAN, K. A.; IN'T VELD, P. H.; HOEKSTRA, J. A.; HEISTERKAMP, S. H.; HAVELAAR, A. H.; NOTERMANS, S. H. W.; ROBERTS, D.; GRIEPINK, B.; MAIER, E. (1992). Development of microbiological reference materials. In:

- VENELINOV, T.; QUEVAUVILLER, P. Are certified reference materials really expensive? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p.15- 18, 2003.
- MOOIJMAN, K. A.; DURING, M.; NAGELKERKE, N. J. D. MICROCRM: Preparation and control of batches of microbiological reference materials consisting of capsules. **RIVM report 250935001**, 2003.
- MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599- 604, 2006.
- OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CE, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 217- 221, 2003.
- PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477- 483, 1998.
- PHILIPP, W. J.; VAN IWAARDEN, P.; SCHIMMEL, H.; MEEUS, N.; KOLLMORGEN, N. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, p. 134- 138, 2007.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E.; Genus XXXIII *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of sistematic bacteriology**, New York: Springer Science e Business Media Inc, 2^a Ed., v. 2, p. 764- 799, 2005.
- USER'S guide: **BAX™ for screening *Salmonella***. Wilmington DE: Qualicon™, L. L. C., 2008. CD-ROOM.

- REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B. D. G. M. Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p.105- 110, 2002.
- RIJPENS, N.; HERMAN, L.; VEREECKEN, F.; JANNES, G.; DE SMEDT, J.; DE ZUTTER, L. Rapid detection on stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 37- 44, 1999.
- RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333- 339, 2004.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M.; ESTEVE, T.; HOORFAR, J.; PLA, M. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 381- 390, 2003.
- RÜCKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H.-D. Determination of the contents of water and moisture in milk powder. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, p. 522- 527, 2000.
- RÜCKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H.-D. Water as a source of errors in reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, p.189-193, 2001.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Illinois: ASM Press, p. 229- 243,1994.
- SCHULTEN, S. M.; IN'T VELD, P. H.; GHAMESHLOU, Z.; SCHIMMEL, H.; LINSINGER, T. **The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella* Typhimurium and number fraction of negative capsules from**

artificially contaminated milk powder, CRM 507R, BCR information reference materials. EUR 19622 EN., 2000.

SHINTANI, T.; YAMADA, K.; TORIMURA, M. Optimization of a rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 245- 249, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 3ª ed., p. 253- 285, 2007.

SILVA-PEREIRA, I. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. (Org.). **Técnicas básicas em biologia molecular**, Brasília: Editora UNB, p. 99- 110, 2003.

SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.118-120, 2003.

STAMP, L. The preservation of bacteria by drying. **Journal of General Microbiology**, v.1, p.251- 265, 1947.

STEFANOVICOVÁ, A.; REHÁKOVÁ, H.; SKARKOVÁ, A.; RIJPENS, N.; KUČHTA, T. Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.1381-1383, 1998.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation- PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1742-1749, 1994.

- TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 315- 322, 1996.
- TERRAGNO, R.; CAFFER, M. I.; BRUNO, S.; BINSZTEIN, N. Manual de procedimientos *Salmonella*: Parte 1- Aislamiento, identificación y serotipificación. **Global Salm-Surv, Ministerio da Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas**, Departamento de Bacteriología, Buenos Aires, Argentina, 2003.
- THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, v. 73, n. 1, p. 89- 98, 1994.
- TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521- 524, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, p. 211- 258, 2005.
- UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 386- 391, 2003.
- VENELINOV, T.; QUEVAUVILLER, P. Are certified reference materials really expensive? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p.15- 18, 2003.
- VON RÜCKERT, D. A. S. Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoenálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de

Salmonella sp. em frangos durante o abate. **Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária**, Viçosa- MG: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006.

WAAGE, A. S.; VARDUND, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 418-428, 1999.

WALKER, R. L.; KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 123- 129, 2001.

WAN, J.; KING, K.; CRAVEN, H.; MCAULEY, C.; TAN, S. E.; COVENTRY, M. J. Probelia™ PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p.267- 271, 2000.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 727- 736, 1997.

WANG, H.; LI, Y.; SLAVIK, M. PCR-based fluorescent method for rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in poultry samples. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 10, p. 86- 92, 2002.

WHO. World Health Organization. **Drug-resistant *Salmonella***. Fact sheet n° 139, rev. april 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

- WHYTE, P.; MC GILL, K.; COLLINS, J. D.; GORMLEY, E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 53- 60, 2002.
- YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. A overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p.189- 204, 2003.
- YAZGAN, S.; BERNREUTHER, A.; ULBERTH, F.; ISENGARD, H.- D. Water- an important parameter for the preparation and proper use of certified reference materials. **Food Chemistry**, v. 96, p. 411- 417, 2006.
- ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.12, p. 5431- 5436, 2001.

CAPÍTULO 2
PREPARO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE
QUANTITATIVA DE *Salmonella*

2.1- INTRODUÇÃO

O uso de material de referência (MR) em laboratórios e a participação regular em ensaios de proficiência são ferramentas fundamentais para assegurar e controlar a qualidade, a precisão e a exatidão de dados analíticos, bem como demonstra o interesse do laboratório em integrar-se a um sistema de gestão da qualidade global. A aplicação dessas ferramentas tem como objetivo detectar falhas nas metodologias analíticas, o que aumenta a comparabilidade das medições entre laboratórios (EMONS, LINSINGER e GAWLIK, 2004). MRs para análise microbiológica de alimentos são, na sua maioria, constituídos de leite em pó contaminado artificialmente pelo microrganismo de interesse (MOOIJMAN *et al.*, 1992 *apud* VENELINOV e QUEVAUVILLER, 2003).

A análise quantitativa de *Salmonella* tem implicação direta nos estudos de sensibilidade a antimicrobianos por estirpes consideradas altamente resistentes como *S. Typhimurium* DT104- ASSuCT (CHEN *et al.*, 2003), no desenvolvimento de modelos de contaminação cruzada para prevenção de enfermidades ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados com este patógeno (KUSUMANINGRUM *et al.*, 2004), nos programas de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) na indústria e na agropecuária (BOUGHTON *et al.*, 2007), nos ensaios de proficiência e no desenvolvimento de métodos rápidos de detecção de patógenos alimentares.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a homogeneidade e a estabilidade de MR com valor de propriedade estabelecido para análise quantitativa de *Salmonella*.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DMB) e no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV)- MG.

2.2.1- Obtenção de células de *Salmonella* para o preparo do MR

Foi utilizada a estirpe *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo PT4 578 gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

A confirmação da pureza da cultura foi feita inoculando-se *S. Enteritidis* PT4-578 em caldo infusão de cérebro e coração- BHI (Difco, Sparks, USA) e, após incubação por 18 horas a 36 ± 1 °C, a cultura ativada foi estriada em ágar padrão para contagem em placas- PCA (Difco, Sparks, USA) e incubada nas mesmas condições. Uma colônia isolada foi estriada em ágar xilose lisina desoxicolato- XLD (Acumedia, Lansing, Michigan) e incubada por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C. Os estoques da cultura foram preparados em microtubos contendo meio BHI acrescido de 20 % de glicerol (v/v), congelado em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C, até o momento de uso.

A obtenção das células de *Salmonella* para preparo do MR contendo, aproximadamente, 10^3 UFC/ g foi realizada de acordo com Schulten *et al.* (2000). *S.*

Enteritidis PT4-578 foi ativada em caldo BHI, por duas vezes consecutivas a 36 ± 1 °C, por 18 a 24 horas. A terceira ativação foi feita em caldo BHI acrescido de 0,1 % de Tween 80 e esferas de vidro e a incubação foi sob agitação (Certomat[®] BS-T, B. Braun Biotech International), a 150 rpm, a 36 ± 1 °C por 14 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 2516 g por 15 minutos (Sorvall RT6000D, Du Pont Sorvall Centrifuges, Newtown, USA). O centrifugado foi lavado, por duas vezes, em solução salina peptonada 0,1 % esterilizada em volume suficiente para concentrar o conteúdo em duas vezes e meia. A suspensão foi agitada por, aproximadamente, cinco minutos em agitador magnético (Fanem Modelo 258, São Paulo, Brasil) e o número de células viáveis determinado pela técnica de plaqueamento em superfície, em PCA. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 18 horas. Esta suspensão de células foi dividida em dois frascos: uma porção foi submetida a estresse nutricional, em solução salina peptonada, por 3 horas a 36 ± 1 °C, sob agitação a 150 rpm, enquanto a outra porção constituiu o tratamento controle, sem estresse nutricional. Ambas as porções foram centrifugadas a 2516 g, por 15 minutos e, então ressuspendidas em leite desnatado reconstituído a 10 % (p/v). Volumes de 3 mL das suspensões de células dos dois tratamentos foram distribuídos em frascos de vidro de 10 mL de capacidade e liofilizadas (Heto Lab. Equipment, Heto-Holten A/S, Denmark) por 24 horas. Este conteúdo foi chamado de leite em pó altamente contaminado (LPAC) e foi utilizado nas etapas de preparo do MR.

2.2.2- Produção do MR

A preparação do leite em pó contaminado foi feita com base no descrito por Schulten *et al.* (2000), com modificações. O leite em pó desnatado e instantâneo foi obtido no comércio local e esterilizado por radiação gama, com a dose de 10 KGy, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN, Minas Gerais, Brasil). O teste de esterilidade do leite irradiado foi realizado em ágar padrão para contagem em placa- PCA (Difco). O leite em pó desnatado (LPD) foi contaminado com células liofilizadas de *S. Enteritidis* (LPAC), seguindo-se esquema estabelecido por Schulten *et al.* (2000) modificado (Quadro 1).

Quadro 1. Esquema de contaminação de leite em pó esterilizado com *Salmonella*.

Quantidade LPAC 1	Quantidade LPD	Mistura (M)
0,3 g LPAC (~10 ⁷ UFC/g)	2,7 g LPD	3 g M1
3 g M1	3 g LPD	6 g M2
6 g M2	6 g LPD	12 g M3
12 g M3	12 g LPD	24 g M4
24 g M4	24 g LPD	48 g M5
48 g M5	48 g LPD	96 g M6
96 g M6	96 g LPD	192 g M7
192 g M7	192 g LPD	384 g M8
200 g M8	200 g LPD	400 g M9
200 g M9	200 g LPD	400 g M10 (~10 ³ UFC/g)

LPAC = leite em pó altamente contaminado com células de *Salmonella* Enteritidis

LPD = leite em pó desnatado esterilizado

Na literatura consultada é relatada que a submissão da célula microbiana ao estresse nutricional pode conferir resistência cruzada a outros fatores estressantes (SCHULTZ e MATIN, 1988; MATIN, 1991; DICKSON e FRANK, 1993; MAUS e INGHAM, 2003; PALMFELDT, RADSTROM e HAHN-HAGERDAL, 2003; CHUNG, BANG e DRAKE, 2006). Para avaliar as condições fisiológicas das células de *Salmonella* que conferissem maior homogeneidade e estabilidade ao MR, foram realizadas duas misturas distintas: uma contendo células de *Salmonella* sem estresse nutricional e a outra com células de *Salmonella* submetidas ao estresse nutricional. Ambas as misturas foram iniciadas com LPAC contendo, aproximadamente, 10⁷ UFC/ g, e etapas de mistura consecutivas em LPD foram feitas para se obter um material com densidade populacional de, aproximadamente, 10³ UFC/ g (Quadro 1). Em cada etapa de preparo, a mistura foi homogeneizada assepticamente com auxílio do gral e pistilo em capela de fluxo laminar. A última mistura foi submetida também à homogeneização em misturador de sólidos esterilizado (Conserli MP/5, São Paulo, Brasil) por, aproximadamente, duas horas. Parte das misturas M8, M9 e M10 foram armazenadas em sacos esterilizados de polipropileno, à -20 °C. Além disso, a

mistura M10 teve porções de um grama distribuídas em frascos de vidro esterilizados, de 10 mL de capacidade, em condições assépticas. Os frascos foram lacrados com lacre de alumínio e estocados a -20 °C. O fluxograma de preparo e avaliação da contagem de colônias de *Salmonella* no MR está apresentado a seguir (Figura 1).

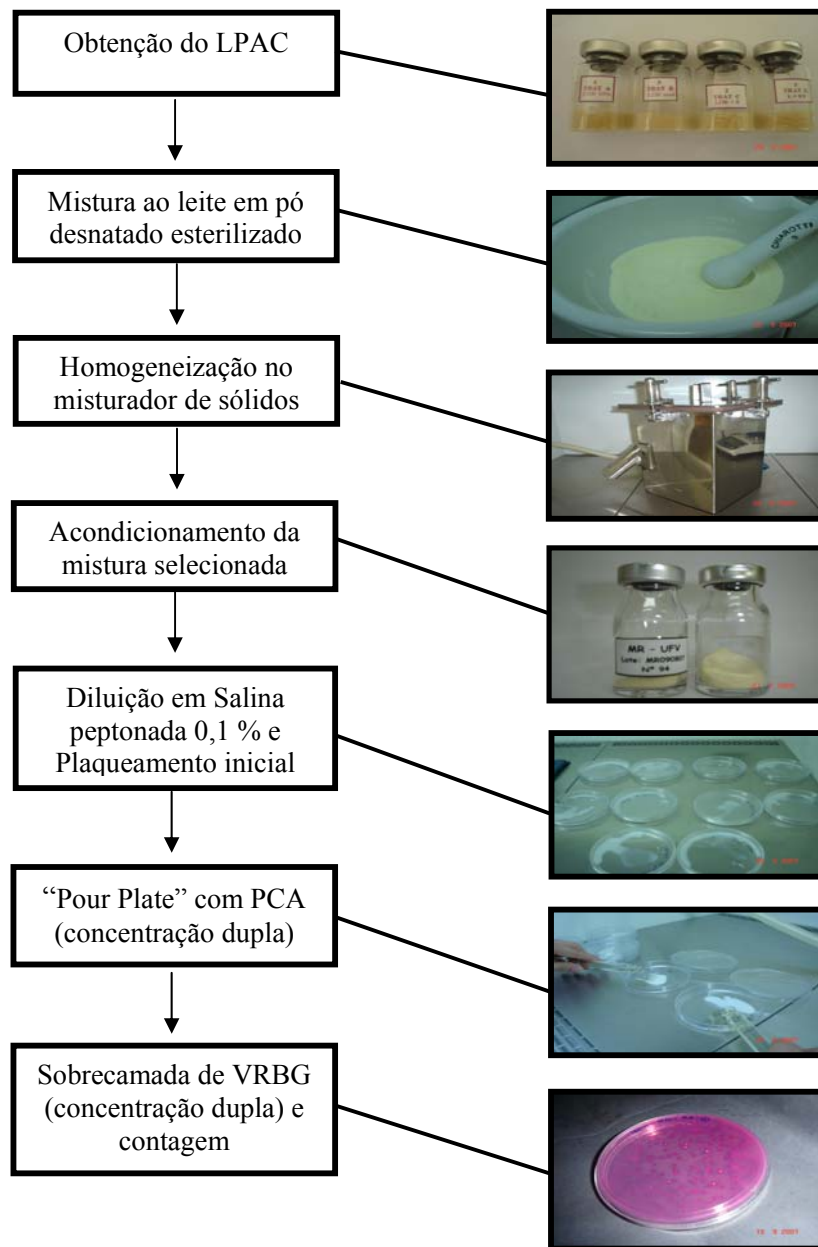


Figura 1- Preparação do MR com células de *Salmonella*.

2.2.3- Avaliação da homogeneidade e estabilidade do MR

A verificação da homogeneidade e estabilidade do MR foi realizada pela determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Salmonella* por grama do MR, de acordo com os procedimentos descritos por Becker *et al.* (1985b) e Schulten *et al.* (2000), que seguem a norma ISO 5552 para determinação da contagem em placa de *Enterobacteriaceae*. O conteúdo de cada frasco contendo um grama do leite contaminado foi dissolvido em 10 mL de solução salina peptonada 0,1 %. Posteriormente, um mililitro foi coletado e depositado em placas de Petri esterilizadas, em duplicata, e misturados com 10 mL de PCA (Difco). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C, por 2,5 horas e, após este período foi adicionada uma sobrecamada de 10 mL de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose- VRBG (Difco) em concentração dupla e as placas foram novamente incubadas a 36 ± 1 °C, por 24 horas e então feita a contagem de colônias típicas (KORNACKI e JOHNSON, 2001). Foi realizado também o controle de esterilidade dos meios de cultura utilizados. Para confirmação da presença de *Salmonella*, colônias típicas foram repicadas em PCA, incubadas a 36 ± 1 °C, por 18 a 24 horas e submetidas às provas bioquímicas de produção de urease, reações em ágar TSI e LIA (Difco) (BRASIL, 2003). Após as provas bioquímicas, realizou-se teste sorológico com soro anti-*Salmonella* polivalente “O” (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

A avaliação da homogeneidade do MR foi feita em 10 frascos amostrados por tempo de estocagem analisado: tempo inicial de preparo (T0), após 30, 60, 90, 150, 210 e 240 dias de estocagem, a -20 °C. A homogeneidade foi expressa como a variação do número de UFC entre as réplicas de um mesmo frasco e entre os frascos amostrados.

Para avaliação da estabilidade do MR foram analisados 10 frascos, a cada 30 dias, durante oito meses de estocagem, a -20 °C, de acordo com Schulten *et al.* (2000).

2.2.4- Ensaio de proficiência

O MR produzido com células de *Salmonella* sem estresse nutricional foi submetido a análise de proficiência do qual participaram, além do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFV, o Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do Rio de Janeiro (INCQS) e o da Fundação de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (CIENTEC). Para isso, 30 frascos contendo o MR foram encaminhados a cada um dos laboratórios, via correios, em caixas isotérmicas com gelo artificial, a 4 °C. Para análise a ser realizada no laboratório da UFV, os 30 frascos contendo o MR ficaram estocados sob refrigeração, a 4 °C, até que os outros laboratórios recebessem o material. Dez destes frascos foram destinados à análise da homogeneidade do MR e os 20 frascos restantes foram distribuídos em lotes de cinco e estocados a -20 °C, 4 °C, 25 °C e 37 °C para a determinação da estabilidade, após 30 dias. Estas análises tiveram como objetivo a escolha da temperatura que melhor mantivesse a viabilidade das células no MR, além de simular os abusos de temperatura no transporte do material.

A determinação do número de células vivas de *Salmonella* no MR foi feita de acordo com procedimento analítico estabelecido em protocolo desenvolvido por pesquisadores do INCQS.

2.2.5- Análise estatística

A homogeneidade foi expressa como a variação do número de UFC/ g entre as réplicas de um mesmo frasco, calculada por meio do teste estatístico de T1, que testa a adequação dos dados à distribuição de Poisson (HEISTERKAMP *et al.*, 1993 *apud* IN'T VELD *et al.*, 1996) e por modelos matemáticos específicos para análise do desvio padrão alvo (σ_p) recomendado pelo FEPAS (Esquema de avaliação de desempenho na análise de alimentos acreditado pelo serviço de acreditação do Reino Unido- UK). A estabilidade foi expressa como a variação do número de células viáveis de *Salmonella* no MR ao longo do tempo de estocagem, com base na análise de regressão linear feita pelo emprego do programa Excell. Os dois tratamentos foram comparados com base no intervalo de

confiança de 95 % de probabilidade do valor da diferença das estimativas dos parâmetros de inclinação da linha de tendência (CAMPBELL e MADDEN, 1990).

2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material de referência preparado com leite em pó desnatado contaminado com células de *Salmonella*, submetidas ou não ao estresse nutricional, resultou em um pó fino e sem grumos.

2.3.1- Homogeneidade e estabilidade do MR

A população média de células viáveis de *Salmonella*, imediatamente após o preparo do MR, foi de $7,7 \times 10^3$ UFC/ g quando se utilizou células sem estresse nutricional e de $2,9 \times 10^3$ UFC/ g no material preparado com células estressadas nutricionalmente.

A variação no número de colônias de *Salmonella* nas porções de 1 g do MR preparado com células não estressadas e estressadas foi de até 0,5 e 1,1 ciclos logarítmicos, respectivamente (Figuras 2 e 3).

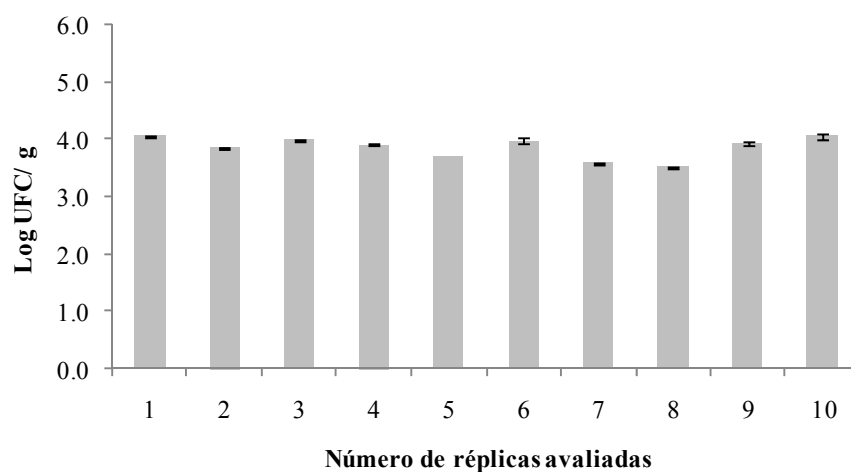


Figura 2- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional imediatamente após o preparo do material. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

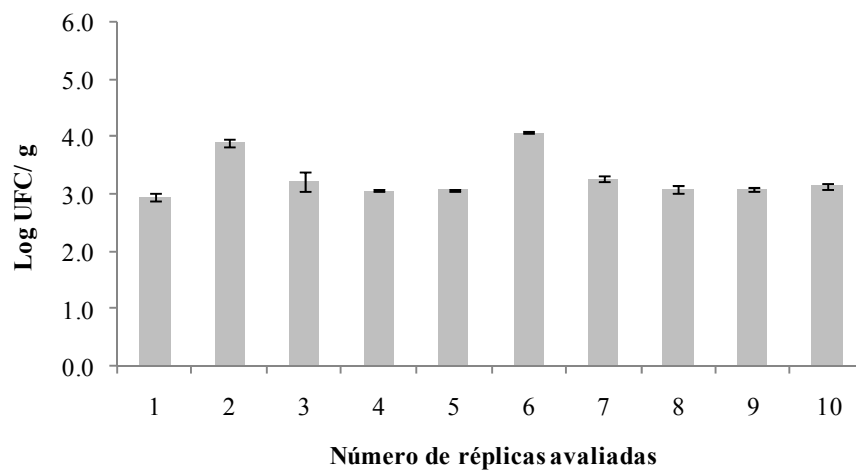


Figura 3- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional imediatamente após o preparo do material. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

O critério de avaliação da homogeneidade é dependente do teste estatístico empregado para avaliação dos dados. Aplicando-se o teste estatístico de T1 recomendado por Heisterkamp *et al.* (1993) *apud* In't Veld *et al.*(1996) para avaliação da homogeneidade da distribuição das células viáveis entre as duplicatas de uma réplica do MR, obtiveram-se os valores de 2,97 para o MR sem estresse nutricional e de 3,83 para o MR com estresse nutricional. O valor sugerido para que o material seja considerado homogêneo é de até 1 e, portanto, os MRs preparados com células de *Salmonella* não seguem a distribuição de Poisson (JANNING *et al.*, 1995). Mooijman, During e Nagelkerke (2003) encontraram valor de T1 para MR contendo de 600 a 1500 UFC/ cápsula de *E. coli* variando de 7,6 a 43,6. Como os dados analisados por esses autores foram obtidos utilizando-se métodos diferentes, eles concluíram que a variação dos resultados é dependente do método empregado e que, quando se analisa separadamente a variação entre as duplicatas de uma réplica, na maioria das vezes é associada a problemas técnicos.

No entanto, quando os dados da contagem em log de UFC foram avaliados por meio de equações matemáticas recomendadas pelo FEPAS, que seguem a distribuição de Cochran's, o material de referência preparado com células sem estresse nutricional apresentou porcentagem de desvio padrão alvo de 16,11 %, o que caracteriza homogeneidade aceitável. O FEPAS considera como homogêneo o material que apresenta porcentagem de desvio padrão alvo de até 25 % (FEPAS, 2005). No entanto, o MR com células estressadas nutricionalmente apresentou porcentagem de desvio padrão alvo de 262,83 %, o que indica a heterogeneidade do material.

Heisterkamp *et al.* (1993) *apud* In't Veld *et al.*(1996) relataram que o mais apropriado seria analisar a relação entre a variância e a média dos valores de log das contagens do número de colônias, em vez de comparar diretamente a variância. O teste estatístico de dispersão de Cochran's segue este princípio e por isso foi recomendado pelo FEPAS.

A viabilidade celular foi mantida nos MRs com 30 dias de estocagem a -20 °C, o que demonstrou a estabilidade dos materiais preparados com células sem estresse nutricional e com células estressadas nutricionalmente. A média da contagem de células viáveis foi de $1,3 \times 10^4$ UFC/ g e $9,8 \times 10^3$ UFC/ g, respectivamente para as células não estressadas e para as células estressadas nutricionalmente.

Os valores médios da contagem de células viáveis no MR sem estresse nutricional, após 30 dias, não diferiram ($p= 0,36$), pelo teste de médias (teste t), da contagem obtida no tempo inicial. Entretanto, no MR preparado com células estressadas, a diferença de contagem entre o número de células viáveis iniciais e após 30 dias foi significativa ($p= 0,0002$). Esta variação pode ser em função da distribuição de células no MR ou em função do método de contagem utilizado por estimativa, que excede o limite de precisão e repetibilidade da técnica. Outra possível explicação é que o estresse nutricional permitiu maior recuperação das células de *Salmonella* sub-letalmente injuriadas pelo congelamento e liofilização quando o MR foi reidratado. Palmfeldt, Radstrom e Hahn-Hagerdal (2003) verificaram que a inanição de células de *Pseudomonas putida* por escassez de fonte de carbono induziu resposta protetora pronunciada contra o estresse gerado pelo processo de liofilização. A etapa de congelamento faz parte do processo de liofilização e, esses mesmos autores observaram que células privadas de fonte de carbono tiveram taxas de sobrevivência de 77 a 100 %, enquanto as que tiveram crescimento exponencial apresentaram taxas de 55 a 80 % de sobrevivência. Resposta similar foi encontrada em estirpes probióticas de *Bifidobacterium* que apresentaram tolerância ao frio e ao ácido quando a cultura ficou em estado de inanição por, aproximadamente, 60 minutos, e, como consequência, induziu genes que codificam fatores transcricionais de resposta a estresse (MAUS e INGHAM, 2003). Entre os dois MRs preparados não houve diferença significativa ($p= 0,709$), após 30 dias de estocagem, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após 60 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o número de células viáveis de *Salmonella* no MR com células submetidas ou não ao estresse nutricional foi reduzido em cerca de 0,6 e 0,3 ciclos logarítmicos, respectivamente. A média da contagem de colônias no MR sem estresse nutricional foi de $4,5 \times 10^3$ UFC/ g e no MR com células estressadas nutricionalmente de $5,7 \times 10^3$ UFC/ g. Não houve diferença significativa entre os MRs ($p= 0,351$). Uma flutuação na média de UFC/ mL de MR de *E. coli* também ocorreu ao longo de 30 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com valores de 40 UFC/ mL a 47 UFC/ mL (JANNING *et al.*, 1995).

Na avaliação do MR contendo *Salmonella* após 90 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ houve manutenção da viabilidade celular em relação a 60 dias de estocagem. A média de contagem do MR sem estresse nutricional foi de $6,6 \times 10^3$ UFC/ g e do MR com células

estressadas nutricionalmente de $6,1 \times 10^3$ UFC/ g. Não houve diferença significativa entre os tratamentos sem e com estresse nutricional ($p= 0,645$).

Após 150 dias de estocagem a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, constatou-se no MR sem estresse nutricional redução de, aproximadamente, 1,1 ciclos logarítmicos, com média de $7,7 \times 10^2$ UFC/ g, o que indicou a falta de estabilidade deste MR. O MR com células estressadas nutricionalmente se manteve estável, com contagem média de $5,1 \times 10^3$ UFC/ g. Houve diferença significativa entre os MRs preparados ($p= 0,0003$).

A estabilidade do MR após 210 dias de estocagem a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ foi mantida e foi registrada contagem média de $2,6 \times 10^3$ UFC/ g no material sem estresse nutricional e de $5,3 \times 10^3$ UFC/ g no material com células estressadas. Quando comparadas as médias entre os dois MRs foi verificada diferença significativa ($p= 0,004$). Martin (1991) e Dickson e Frank (1993) relataram que células que sobreviveram ou se adaptaram a condições de estresse nutricional induziam a síntese de diversas proteínas que aumentavam a resistência a vários estresses. Chung, Bang e Drake (2006) acrescentam ainda que, em *E. coli*, duas classes de genes codificam proteínas para o estresse nutricional: os genes *cst*, para inanição por fonte de carbono; e os genes *pex*, controlados por inanição a fontes de carbono, nitrogênio ou fósforo. Diversos trabalhos realizados com células de *E. coli* submetidas a condição de estresse nutricional mostram a indução de proteção cruzada ao frio (SCHULTZ e MATIN, 1988); ao calor (ROWE e KIRK, 2000); a químicos (JENKINS *et al.*, 1988; MATIN *et al.*, 1989; HENGGE-ARONIS, 1993); ao estresse osmótico (JENKINS *et al.*, 1990); e ao ácido (JACKSON *et al.*, 1996; ELHANAFI *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2004).

Aos 240 dias de estabilidade a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a contagem média de *Salmonella* no MR feito sem células estressadas foi de $1,2 \times 10^3$ UFC/ g e do MR feito com células estressadas foi de $1,5 \times 10^3$ UFC/ g. Não houve diferença significativa entre as médias dos MRs com e sem estresse nutricional ($p= 0,136$).

O teste estatístico de T1 para avaliação da homogeneidade do MR com e sem estresse nutricional durante os 240 dias de estocagem a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ estão apresentados na Tabela 1. Os valores de T1/ I superiores ao recomendado para este tipo de material (T1/ I < 1) demonstraram a heterogeneidade existente no material avaliado.

Tabela 1- Valores do teste de T1 para avaliação da homogeneidade do MR.

Valores de T1/ I		
Tempo de estocagem (dias)	MR Sem estresse nutricional	MR Com estresse nutricional
0	2,97	3,83
30	116,20	14,63
60	6,20	9,35
90	4,02	14,91
150	1,26	5,26
210	0,66	6,91
240	1,59	2,19

A viabilidade das células de *Salmonella* submetidas ao estresse nutricional não variou ao longo do tempo de estocagem a -20 °C (Figura 4). A estimativa do parâmetro referente à inclinação da reta não diferiu de zero ($p= 0,72$). Para o MR feito com células sem estresse nutricional, houve perda na viabilidade celular ao longo do tempo, o que indicou a falta de estabilidade nas condições utilizadas. Aparentemente, células de *Salmonella*, quando submetidas a condições de inanição em salina peptonada, desenvolveram melhor proteção aos efeitos do congelamento e da desidratação.

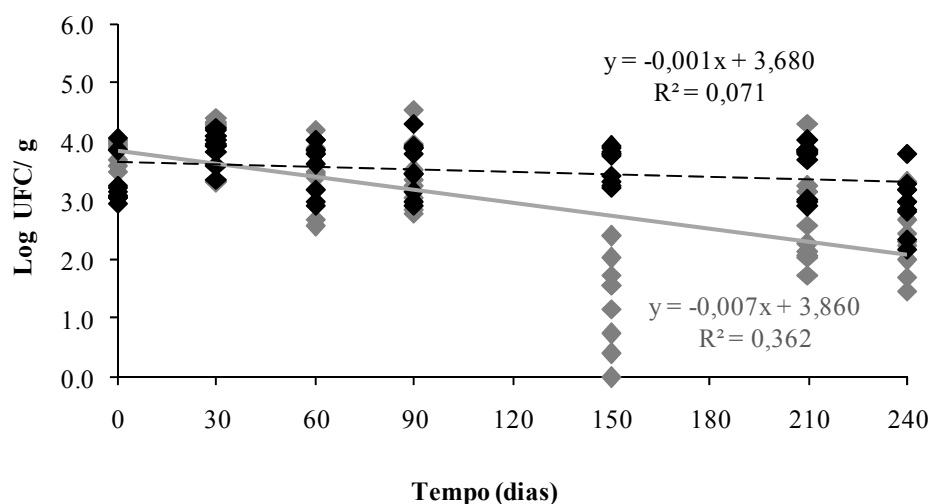


Figura 4- Regressão linear dos valores médios do logaritmo do número de UFC/ g de *Salmonella* nas 10 réplicas de MR em função do tempo de estocagem, a -20 °C: (♦) sem estresse nutricional; (◆) com estresse nutricional.

Embora ao se analisar o coeficiente de inclinação da reta tenha sido constatada resistência nas células de *Salmonella* estressadas no MR, não evidenciou diferença significativa entre as estimativas desse coeficiente quando se compararam os modelos ajustados para células com e sem estresse nutricional. A diferença entre as estimativas de parâmetros foi analisada pelo intervalo de confiança a 95 % de probabilidade e verificou-se que o zero fazia parte deste intervalo. Portanto, não houve diferença significativa entre a inclinação da reta dos dois MRs produzidos. A variação nos valores de contagem de UFC/g de MR, feito sem estresse nutricional, aos 150 dias de estocagem podem ter dificultado a detecção de diferenças significativas entre as estimativas (Figura 4).

2.3.2- Ensaio de proficiência

No ensaio de proficiência conduzido simultaneamente pelos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos da UFV, da CIENTEC e do INCQS, com MR produzido com células não submetidas ao estresse nutricional foi observada homogeneidade aceitável do MR, em dois dos três laboratórios, de acordo com os índices propostos pelo FEPAS que preconizam a porcentagem do desvio padrão alvo de até 25 % (Tabela 2).

Tabela 2- Logarítmico de UFC de *Salmonella*, desvio padrão alvo e homogeneidade do MR preparado com células de *Salmonella* e analisado em diferentes laboratórios.

AVALIAÇÃO MR (Laboratórios)	Média do log de UFC/ g	Desvio Padrão Alvo (σ)	Percentual do σ
UFV	2,85	0,46	16,11%
CIENTEC	2,03	0,50	24,66%
INCQS	1,75	1,04	59,32%

* σ calculado de acordo com FEPAS (2005)

*Homogeneidade: até 25 % aceitável pelo FEPAS

Houve diferença significativa entre a média do logarítmico de UFC/ g do MR avaliado pelos laboratórios da UFV e CIENTEC ($p < 0,001$) e UFV e INCQS ($p < 0,001$).

Entretanto, não houve diferença significativa entre CIENTEC e INCQS ($p= 0,09$). Apesar da utilização de um único protocolo para recuperação das células de *Salmonella* no MR, isto é, a padronização dos procedimentos técnicos utilizados nos diferentes laboratórios, fatores não-mensuráveis, como os descritos por Corry *et al.* (2007), podem ter contribuído na contagem de UFC/ g do MR. Além disso, cabe ressaltar que o material avaliado pela UFV foi mantido refrigerado a 4 °C até o momento de uso, enquanto que o material encaminhado ao CIENTEC e INCQS foi recebido após 2 e 3 dias, respectivamente, em temperatura ambiente de 25 °C. A manutenção sob refrigeração pode ter contribuído para a obtenção de números mais elevados na contagem de UFC/ g de material analisado pelo laboratório da UFV e, conseqüentemente, nos valores da porcentagem do desvio padrão alvo.

Os laboratórios participantes do ensaio de proficiência verificaram a redução na população de células viáveis de *Salmonella* no MR estocado a 25 e 37 °C (Tabela 3 e Figura 5). Estes dados corroboram aos encontrados por Beckers *et al.* (1985b) que descreveram redução acentuada de células viáveis de *Salmonella* durante estocagem do MR a 37 °C, e manutenção da viabilidade deste patógeno durante estocagem do MR a 4 °C, por 120 dias. In't Veld *et al.* (1996) observaram a estabilidade do MR com *S. Typhimurium* em cápsulas de gelatina contendo 5 UFC/ cápsula, por quatro semanas a -20, 22, 30 e 37 °C. Foi verificado por esses autores que a -20 °C e 37 °C o resultado no número de UFC/ cápsula não foi linear e por isso não pôde ser determinado o coeficiente de regressão; a 22 °C os autores não verificaram diminuição significativa da população; e a 30 °C houve um decréscimo de 3% na viabilidade de *Salmonella* por dia.

Esses resultados reforçaram a importância da escolha da temperatura de estocagem adequada, o que influencia diretamente na recuperação das células do MR e indicam que abusos de temperatura na estocagem e no transporte do material podem afetar sua qualidade (JANNING *et al.*, 1995).

Tabela 3- Média da contagem de células viáveis no MR obtida pelos laboratórios participantes do ensaio de proficiência para avaliação da estabilidade após 30 dias de estocagem.

Estabilidade do MR (Temperatura)	Média UFC/ g *		
	UFV	CIENTEC	INCQS
-20 °C	64,1	45,2	44,2
4 °C	76,2	22,6	75,7
25 °C	0	0,2	1,6
37 °C	0	0	0,1

*Média geral do número de células viáveis de *Salmonella* no MR

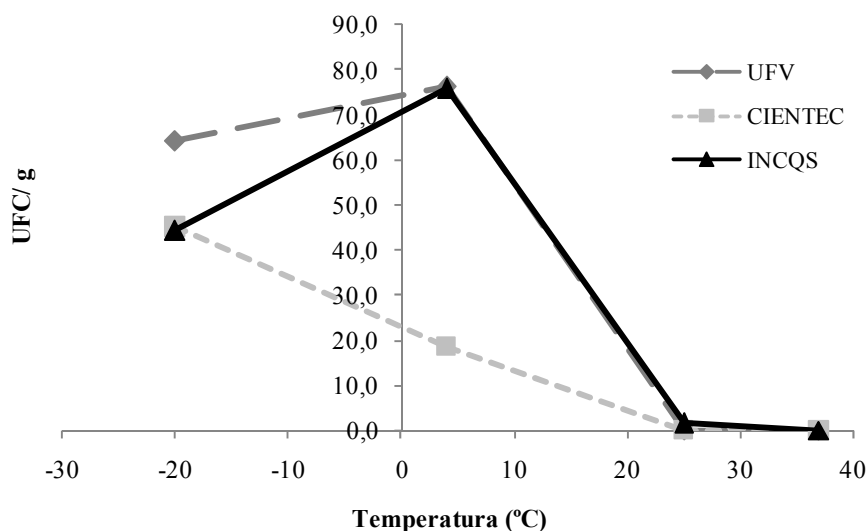


Figura 5- Avaliação da estabilidade do MR sem estresse nutricional estocados por 30 dias em diferentes temperaturas de estocagem no Ensaio de Proficiência.

Novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de buscar alternativas para o preparo melhor de células de *Salmonella* tolerantes à variações de temperatura a que são submetidas nas etapas de transporte e estocagem. Uma possibilidade é o uso de agentes crioprotetores, como a trealose, no preparo da célula para liofilização. De acordo com Leslie *et al.* (1995) a adição de um dissacarídeo antes da secagem diminui a temperatura de

transição (T_m) da membrana seca pela troca da água entre os grupos apolares de lipídios, o que previne a fase de transição e seu conseqüente rompimento durante a reidratação.

O preparo do MR, junto com os testes de homogeneidade, estabilidade e o ensaio de proficiência constituem o primeiro passo para o processo de certificação do material para o lote produzido.

2.4- CONCLUSÕES

O MR produzido não se apresentou suficientemente homogêneo quando analisado pelo teste estatístico de T1, mas foi considerado homogêneo pela porcentagem de σ_p segundo o FEPAS.

Não houve diferença significativa entre a homogeneidade e a estabilidade do MR preparado com células de *Salmonella* estressadas ou não estressadas nutricionalmente por privação de fonte de carbono.

Novos estudos deverão ser realizados com intuito de melhorar a resistência de *Salmonella* as condições de desidratação e congelamento.

2.5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; MEIJSSSEN, M. J. M.; KAMPELMACHER, E. H. Reference material for the evaluation of the standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 507- 512, 1985b.
- BOUGHTON, C.; EGAN, J.; KELLY, G.; MARKEY, B.; LEONARD, N. Quantitative examination of *Salmonella spp.* in the lairage environment of a pig abattoir. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 1, p. 26- 32, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, 26 ago. 2003. Manual de Métodos de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Brasília D.F.: **Diário Oficial da União**, nº 181, seção 1, p. 14- 51, 2003.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Ed. Wiley, p. 195- 197, 1990.
- CAMPBELL, J.; BANG, W.; ISONHOOD, J.; GERARD, P. D.; DRAKE, M. A. Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, p. 727- 735, 2004.

- CHEN, K. L.; YEH, C. N.; LEE, H. C.; TSAI, C. L.; CHIU, H. Y.; WANG, T. K.; LEE, C. L.; SU, H. P.; WU, H. S.; LIN, T. H. Analysis of the trend of drug resistance of *Salmonella typhimurium* in Taiwan, 1991- 2001. **Epidemiology Bulletin**, v. 19, n. 12, p. 1- 303, 2003.
- CHUNG, H. J.; BANG, W.; DRAKE, M. A. Stress response of *Escherichia coli*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 52- 64, 2006.
- CORRY, J. E. L.; JARVIS, B.; PASSMORE, S.; HEDGES, A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. **Food Microbiology**, v. 24, p. 230- 253, 2007.
- DICKSON, J. S.; FRANK, J. F. Bacterial starvation stress and contamination of beef. **Food Microbiology**, v. 10, p. 215- 222, 1993.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, Washington DC: American Public Health Association- APHA, 4^a ed., 2001.
- ELHANAFI, D.; LEENANON, B.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Impact of cold and cold-acid stress on post-stress tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 19- 26, 2004.
- EMONS, H.; LINSINGER, T. P. J.; GAWLIK, B. M. Reference materials: terminology and use. Can't one see the forest for the trees? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 442- 449, 2004.
- FEPAS- Food Examination Performance Assessment Scheme. **Proficiency Testing**, Assessment 104 Report, UK: Food Examination Performance Assessment Scheme, 2005.

HEISTERKAMP, S. H.; HOEKSTRA, J. A.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MOOIJMAN, K. A.; IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. H. W. (1993). Statistical analysis of certification trials for microbiological reference materials. In: IN'T VELD, P.H.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MAIER, E. A. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 496- 504, 1996.

HENGGE-ARONIS, R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. **Cell**, v. 72, p. 165- 168, 1993.

IN'T VELD, P. H.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MAIER, E. A. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p.496- 504, 1996.

JACKSON, T. C.; HARDIN, M. D.; ACUFF, G. R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage temperature and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 230-2037, 1996.

JANNING, B.; IN'T VELD, P. H.; MOOIJMAN, K. A.; HAVELAAR, A. H. Development, production and certification of microbiological reference material. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240- 245, 1995.

JENKINS, D. E.; CHAISSON, S. A.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 2779- 2781, 1990.

- JENKINS, D. E.; SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3910-3914, 1988.
- KUSUMANINGRUM, H. D.; VAN ASSELT, E. D.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter spp.* via domestic kitchen surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1892-1903, 2004.
- LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592- 3597, 1995.
- MATIN, A.; AUGER, E. A.; BLUM, P. H.; SCHULTZ, J. E. Genetic basis starvation survival in non-differentiating bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 43, p. 293- 316, 1989.
- MATIN, A. The molecular basis if carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 3- 10, 1991.
- MAUS, J. E.; INGHAM, S. C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid- tolerance of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 146- 154, 2003.
- MOOIJMAN, K. A.; DURING, M.; NAGELKERKE, N. J. D. MICROCRM: **Preparation and control of batches of microbiological reference materials consisting of capsules**. Report 250935001, RIVM, 2003.
- MOOIJMAN, K. A.; IN'T VELD, P. H.; HOEKSTRA, J. A.; HEISTERKAMP, S. H.; HAVELAAR, A. H.; NOTERMANS, S. H. W.; ROBERTS, D.; GRIEPINK, B.; MAIER, E. (1992). Development of microbiological reference materials. In:

- VENELINOV, T.; QUEVAUVILLER, P. Are certified reference materials really expensive? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p.15- 18, 2003.
- PALMFELDT, J.; RADSTROM, P.; HAHN-HAGERDAL, B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. **Cryobiology**, v. 47, p. 21- 29, 2003.
- QUEVAUVILLER, P.; Requirements for production and use of Certified Reference Materials for speciation analysis: A European Commission perspective. EUROPEAN COMMISSION, DG XII, SM&T PROGRAMME (MO75 3/9). **Spectrochimica Acta Part B**, n. 53, p. 1261- 1279, 1998.
- ROLTER, R.; SIEGELE, D. A.; TORRNO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Annual Reviews Microbiology**, v. 47, p. 855- 874, 1993.
- ROWE, M. T.; KIRK, R. B. Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1745- 1748, 2000.
- SCHULTEN, S. M.; IN'T VELD, P. H.; GHAMESHLOU, Z.; SCHIMMEL, H.; LINSINGER, T. **The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella* Typhimurium and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk powder.** CRM 507R. EUR 19622. BCR information reference materials, 2000.
- SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Regulation of carbon starvation genes in *Escherichia coli*. **FEMS Symposium**, v. 44, p. 50- 60, 1988.

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE *Salmonella* EM MATERIAL DE REFERÊNCIA

3.1- INTRODUÇÃO

Em função dos riscos que *Salmonella* representa para os consumidores, sua pesquisa em alimentos é de fundamental importância (WHYTE *et al.*, 2002; WANG, LI e SLAVIK, 2002; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002). No entanto, a técnica convencional de detecção utiliza protocolos fastidiosos, que podem levar até cinco dias para assegurar a ausência deste patógeno em uma amostra de alimento (FERRETTI *et al.*, 2001; SCHRANK *et al.*, 2001). Técnicas fundamentadas na reação antígeno-anticorpo e na hibridização de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidas e o emprego destes métodos alternativos é freqüente em trabalhos científicos (LI e MUSTAPHA, 2002; WANG e YEH, 2002; UYTTENDAELE, VANWILDEMEERSCH e DEBEVERE, 2003; DE MEDICI *et al.*, 2003; CASTAGNA *et al.*, 2005; MYINT *et al.*, 2006; CORTEZ *et al.*, 2006; BOHAYCHUK *et al.*, 2007).

O uso do MR para verificar a sensibilidade de diferentes metodologias para detecção de *Salmonella* é um procedimento inovador e tem como objetivo corroborar com a escolha apropriada da metodologia para detecção deste patógeno quando presente em pequeno número no alimento e diminuir a ocorrência de resultados falso-negativos.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar diferentes metodologias de detecção de *Salmonella* no MR e avaliar a homogeneidade e estabilidade do MR.

3.2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)- MG.

3.2.1- Obtenção de células de *Salmonella* para produção do MR

Foi utilizada a estirpe *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo PT4-578 gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- INCQS da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

A confirmação da pureza da cultura foi feita inoculando-se *S. Enteritidis* PT4-578 em caldo BHI (Difco, Sparks, USA) e, após incubação por 18 horas, a 36 ± 1 °C, a cultura ativada foi estriada em ágar padrão para contagem em placa- PCA (Difco, Sparks, USA) e incubada nas mesmas condições. Uma colônia isolada foi estriada em ágar xilose lisina desoxicolato- XLD (Acumedia, Lansing, Michigan) e incubada por mais 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C. Os estoques da cultura foram preparados em microtubos contendo caldo BHI acrescido de 20 % de glicerol (v/v), congelado em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C, até o momento de uso.

A obtenção das células de *Salmonella* para o preparo do MR contendo aproximadamente 10^1 UFC/ g foi realizada de acordo com Schulten *et al.*, 2000. *S. Enteritidis* PT4-578 foi ativada por duas vezes consecutivas por 18 a 24 horas, a 36 ± 1 °C. A terceira ativação foi feita em caldo BHI acrescido de 0,1 % de Tween 80 e esferas de vidro e a incubada foi sob agitação (Certomat[®] BS-T, B. Braun Biotech International) de 150 rpm a 36 ± 1 °C, por 14 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 2516 g, por 15 minutos (Sorvall RT6000D, Du Pont Sorvall Centrifuges, Newtown, USA). O centrifugado foi lavado por duas vezes em solução salina peptonada 0,1 % estéril em volume suficiente para diluir o conteúdo em dez vezes. A suspensão foi agitada por alguns minutos em agitador magnético (Fanem Modelo 258, São Paulo, Brasil) e o número de células viáveis determinado pela técnica de plaqueamento em superfície em PCA. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 18 horas. Esta suspensão de células foi submetida a estresse nutricional por 5 horas a 36 ± 1 °C sob agitação de 150 rpm. A razão do estresse nutricional foi a indicação de desagregação celular, por estudos prévios, o que permitiria maior homogeneidade do MR. Após o estresse nutricional, as células foram centrifugadas a 2516 g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o centrifugado foi ressuspenso em leite desnatado reconstituído a 10 %. Volumes de 3 mL das suspensões de células dos dois tratamentos foram distribuídos em frascos de vidro de 10 mL de capacidade e posteriormente liofilizadas (Heto Lab. Equipment, Heto-Holten A/S, Denmark) por 24 horas. Este conteúdo foi chamado de leite em pó altamente contaminado (LPAC) e foi utilizado nas etapas de preparo do MR.

3.2.2- Produção do MR

A preparação do leite em pó contaminado com população de 10^1 número de unidades formadoras de colônia (UFC)/g de *Salmonella* foi feita de acordo com Schulten *et al.* (2000). O leite em pó desnatado e instantâneo foi obtido no comércio local e esterilizado por radiação gama com a dose de 10 KGy no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN, Minas Gerais, Brasil). O teste de esterilidade do leite irradiado foi realizado em ágar não seletivo PCA (Difco). O leite em pó desnatado (LPD) foi

contaminado com células liofilizadas de *S. Enteritidis* (leite em pó altamente contaminado-LPAC), seguindo esquema estabelecido por Schulten *et al.* (2000), modificado e apresentado no Quadro 1.

Quadro 1- Esquema de contaminação de leite em pó esterilizado com *Salmonella*.

Quantidade LPAC 1	Quantidade LPD	Mistura (M)
0,25 g LPAC (~10 ⁶ UFC/g)	2,25 g LPD	2,5 g M1
2,5 g M1	22,5 g LPD	25 g M2
25 g M2	25 g LPD	50 g M3
50 g M3	50 g LPD	100 g M4
100 g M4	100 g LPD	200 g M5
200 g M5	200 g LPD	400 g M6
200 g M6	200 g LPD	400 g M7 (10 ¹ UFC/g)

LPAC = leite em pó altamente contaminado com células de *Salmonella*

LPD= leite em pó desnatado esterilizado

A mistura foi iniciada com LPAC contendo, aproximadamente, 10⁶ UFC/ g, e após etapas consecutivas de mistura em LPD, foi obtido material com densidade populacional de aproximadamente 10¹ UFC/g. Cada etapa de mistura foi homogeneizada com auxílio do gral e pistilo em capela de fluxo laminar e em misturador de sólidos (Conserli MP/5, São Paulo, Brasil). As misturas M6 e M7 (Quadro 1) foram armazenadas em sacos esterilizados de polipropileno, à -20 °C. Porções de um grama da mistura M7 foram distribuídas em frascos de vidro esterilizados, de 10 mL de capacidade, em condições assépticas. Os frascos foram lacrados com lacre de alumínio e estocados a 4 °C. Foram realizados três lotes do MR nas condições descritas acima. O fluxograma de preparo e avaliação da contagem de colônias de *Salmonella* na mistura está apresentado a seguir (Figura 1).

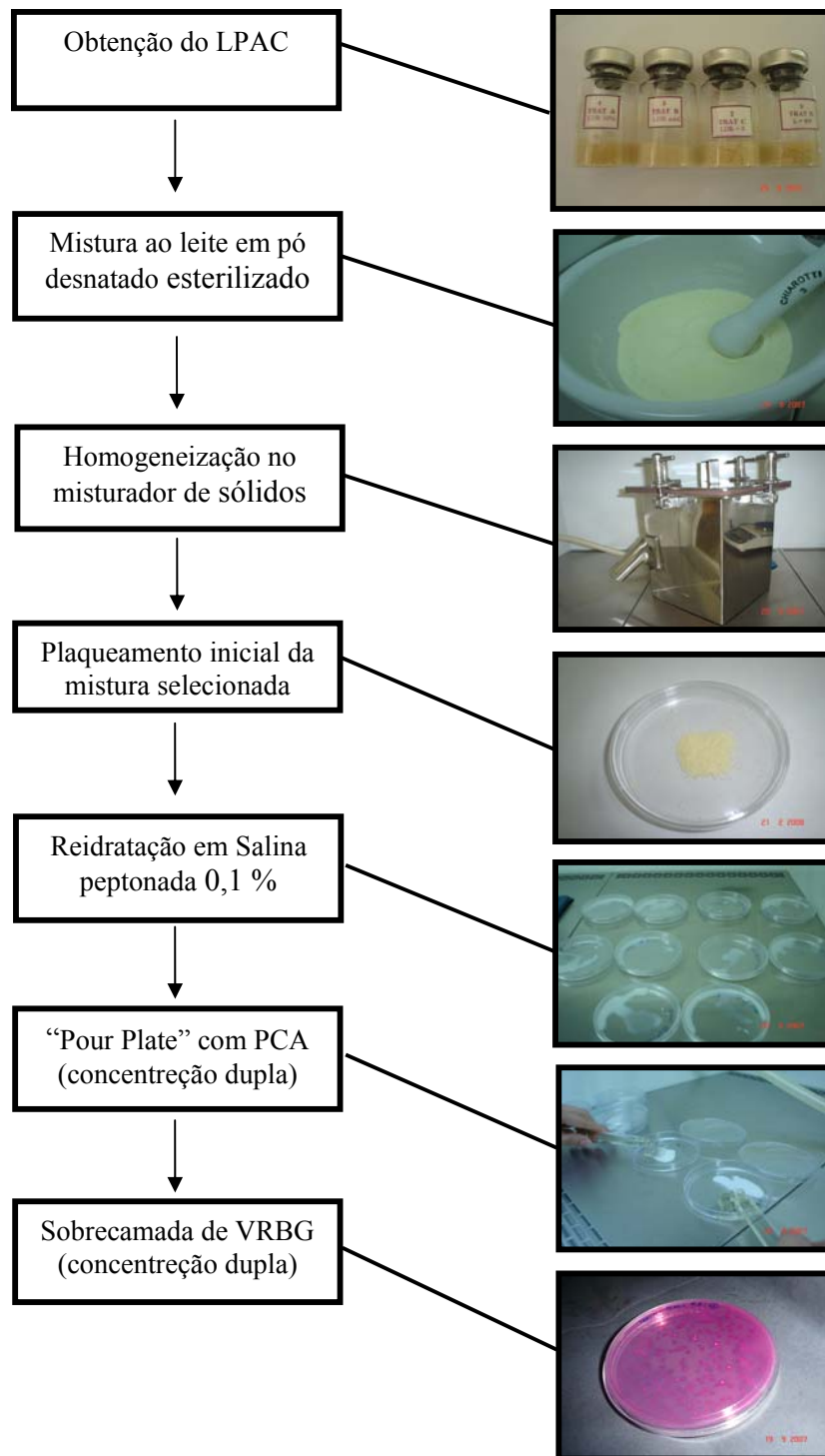


Figura 1- Preparação do MR com células de *Salmonella*

3.2.3 - Avaliação da homogeneidade e estabilidade do MR

A verificação da homogeneidade e estabilidade do MR foi realizada pela contagem de colônias de *Salmonella* em um grama do material acondicionado em frascos e de acordo com os procedimentos descritos por Beckers *et al.* (1985b) com modificações e Schulten *et al.* (2000), que seguem a norma ISO 5552 para determinação da contagem em placa de *Enterobacteriaceae*. Cada porção de um grama do MR foi dissolvida em 5 mL de salina peptonada 0,1 % em placa de Petri e misturada a 5 mL de PCA (Difco) em concentração dupla. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 2,5 horas, e após este tempo foi adicionada uma sobrecamada de 10 mL de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose-VRBG (Difco) em concentração dupla e as placas foram novamente incubadas a 36 ± 1 °C por 24 horas e então feita a contagem de colônias típicas (KORNACKI e JOHNSON, 2001). Para confirmação, colônias típicas de *Salmonella* foram repicadas em PCA (Difco), incubadas a 36 ± 1 °C, por 18 a 24 horas e submetidas às provas bioquímicas de produção de urease, reações em ágar TSI e LIA (Difco) (BRASIL, 2003). Após as provas bioquímicas foi realizado teste sorológico com soro anti-*Salmonella* polivalente “O” (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

Para avaliação da homogeneidade do MR foram analisados 10 frascos no tempo inicial (T0), e após 60 dias de estocagem a 4 °C (IN'T VELD *et al.*, 1996). A homogeneidade do MR foi expressa como a variação do número de UFC entre os frascos.

Para avaliação da estabilidade do MR foram analisados 10 frascos com 60 dias de estocagem a 4 °C, de acordo com In't Veld *et al.* (1996) e Schulten *et al.* (2000).

3.2.4 - Comparação de metodologias de detecção de *Salmonella* no MR

3.2.4.1 - Metodologia Convencional

Foram utilizados dois métodos convencionais de detecção de *Salmonella* em alimentos: o método preconizado na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura e Pecuária de abastecimento do Brasil- MAPA (BRASIL, 2003); e o método

preconizado pelo Manual online de Análise Bacteriológica da Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA- BAM/ FDA (ANDREWS e HAMMACK, 2008). Inicialmente 10 porções de 1g do MR contendo, aproximadamente, 10^1 UFC/ g foram submetidas à etapa de pré-enriquecimento em dois diluentes: 9 mL de solução salina peptonada 1% tamponada (BRASIL, 2003) e 9 mL de água destilada adicionada de 0,1 % de verde brilhante (ANDREWS e HAMMACK, 2008) por 16 a 20 horas, a 36 ± 1 °C. Aliquotas de 3 mL foram retiradas de cada caldo de pré-enriquecimento bem homogeneizado e congeladas em microtubos para análises posteriores de PCR convencional e em tempo real.

A partir dos caldos de pré-enriquecimento, 1 mL foi transferido de cada caldo para 10 mL do caldo Selenito-Cistina (Acumedia, Lansing, Michigan), e 0,1 mL para 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco). Esta é a etapa de enriquecimento seletivo. Os caldos seletivos foram incubados em banho-maria (B. Braum Biotech International 18BUIO) à $41 \pm 0,5$ °C, por 24 horas (BRASIL, 2003).

A etapa de plaqueamento seletivo ocorreu nos meios BPLS (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e XLD (Acumedia) (BRASIL, 2003). Uma alçada de cada caldo de enriquecimento seletivo foi coletada e depositada na superfície dos meios sólidos através da técnica de estria cruzada. As placas ficaram incubadas a 36 ± 1 °C, por 24 horas. Colônias típicas foram repicadas em PCA (Difco, Sparks, USA) e incubadas a 36 ± 1 °C, por 18 a 24 horas e submetidas as provas bioquímicas de produção de urease (Difco), reações em ágar TSI (Difco), LIA (Difco). Após as provas bioquímicas foi realizado o teste sorológico com soro anti-*Salmonella* polivalente “O” (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). A metodologia convencional foi feita com amostras recém preparadas (T0) e com amostras estocadas a 4 °C, por 60 dias. Em todas as etapas do método convencional foi utilizada também a estirpe de *S. Enteritidis* PT4 578 ativada em caldo BHI, como controle positivo.

3.2.4.2 - Imunoanálise

O teste VIDAS[®] *Salmonella* (SLM) é um método imunoenzimático reconhecido pela AOAC (2005) e foi realizado para amostras recém-preparadas e para amostras estocadas por 60 dias para avaliação da sensibilidade da metodologia.

Para a realização do método imunoenzimático foram utilizadas amostras advindas da etapa de enriquecimento seletivo do método convencional. Após 6 horas de incubação dos caldos de enriquecimento seletivo (SC e RV) à $41 \pm 0,5$ °C, um mililitro de cada caldo foi transferido para 10 mL de caldo “M” (SPERBER e DEIBEL, 1969), um caldo de pós-enriquecimento recomendado pelo fabricante do kit de imunoenálise VIDAS[®] (MANUAL, 2007). O caldo “M” também ficou incubado em banho-maria à $41 \pm 0,5$ °C por 18 horas. A partir do caldo “M”, alíquotas de 1 mL referente aos dois caldos de enriquecimento seletivo de uma mesma amostra foram misturadas em tubo de ensaio e submetidas à fervura, a 100 °C em banho-maria, por 15 minutos afim de expor os antígenos somáticos de *Salmonella*. Depois foram seguidas as recomendações do fabricante do VIDAS[®] (MANUAL, 2007) para utilização kit.

3.2.4.3 - Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica de PCR automatizada foi realizada para amostras do MR recém preparado e com 60 dias de estocagem. Para extração do DNA e amplificação dos oligonucleotídeos específicos de *Salmonella*, foi utilizado o kit BAX System (Du Pont Qualicon, Wilmington, USA) que é recomendado pela AOAC (2006). A partir dos caldos de pré-enriquecimento usados na metodologia convencional, alíquotas de 20 µL foram pós-enriquecidas em 1 mL de caldo BHI por 3 horas, a 36 ± 1 °C, segundo instruções do fabricante do kit. Esta etapa visou diluir os interferentes do meio de pré-enriquecimento e da matriz alimentar que poderiam interferir na reação de PCR. Em seguida, foi preparado o tampão de lise e realizada a extração do DNA. O DNA foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o momento do uso (USER'S Guide, 2008). As análises de PCR automatizada foram realizadas no aparelho BAX Q7 e conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2.5 – Análise estatística

A homogeneidade do MR foi expressa como a variação do número de UFC/ g de MR entre os frascos, analisadas pelo teste estatístico de T2, que se baseia no índice de dispersão de Cochran's (HEISTERKAMP *et al.*, 1993 apud IN'T VELD *et al.*, 1996).

A estabilidade do MR a 4°C, por 60 dias, foi verificada pela análise de variância entre as contagens com o programa SAS® e pelo teste de médias (teste t) realizado por meio do programa Excell.

O teste de Qui-Quadrado (X^2) foi utilizado para a análise das possíveis diferenças de detecção de *Salmonella* entre os métodos microbiológicos convencional, imunoanalítico e PCR. O procedimento estatístico do cálculo de Qui-quadrado foi realizado utilizando-se o programa Epiinfo versão 6.04, do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) da Organização Mundial de Saúde, que utiliza como hipótese nula (H_0) a não associação entre as variáveis. Foram utilizados os valores de “p” do teste exato de Fisher, quando existiam caselas na tabela 2x2 com valor esperado menor que cinco. Este programa também foi utilizado para calcular os índices de concordância entre os métodos utilizados.

3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1- Material de Referência com número baixo de *Salmonella*

O MR preparado com leite em pó desnatado contaminado com células de *Salmonella* resultou em um pó fino e sem grumos. Após reidratação do material e homogeneização em placa, não foi constatada a presença de grumos ou partículas de leite em pó sem dissolução. Este é um fator importante que deve ser observado quando se prepara um MR com 10^1 UFC/ g. Trabalhos como o de Schulten *et al.* (2000) relataram que os grumos que não dissolveram por completo podem provocar uma variação no valor da contagem de colônias e comprometer sua homogeneidade final.

3.3.2- Homogeneidade e estabilidade do MR

Os resultados da contagem das colônias do MR preparado com 10^1 UFC/ g no primeiro, segundo e terceiro lotes estão apresentados na Figura 2.

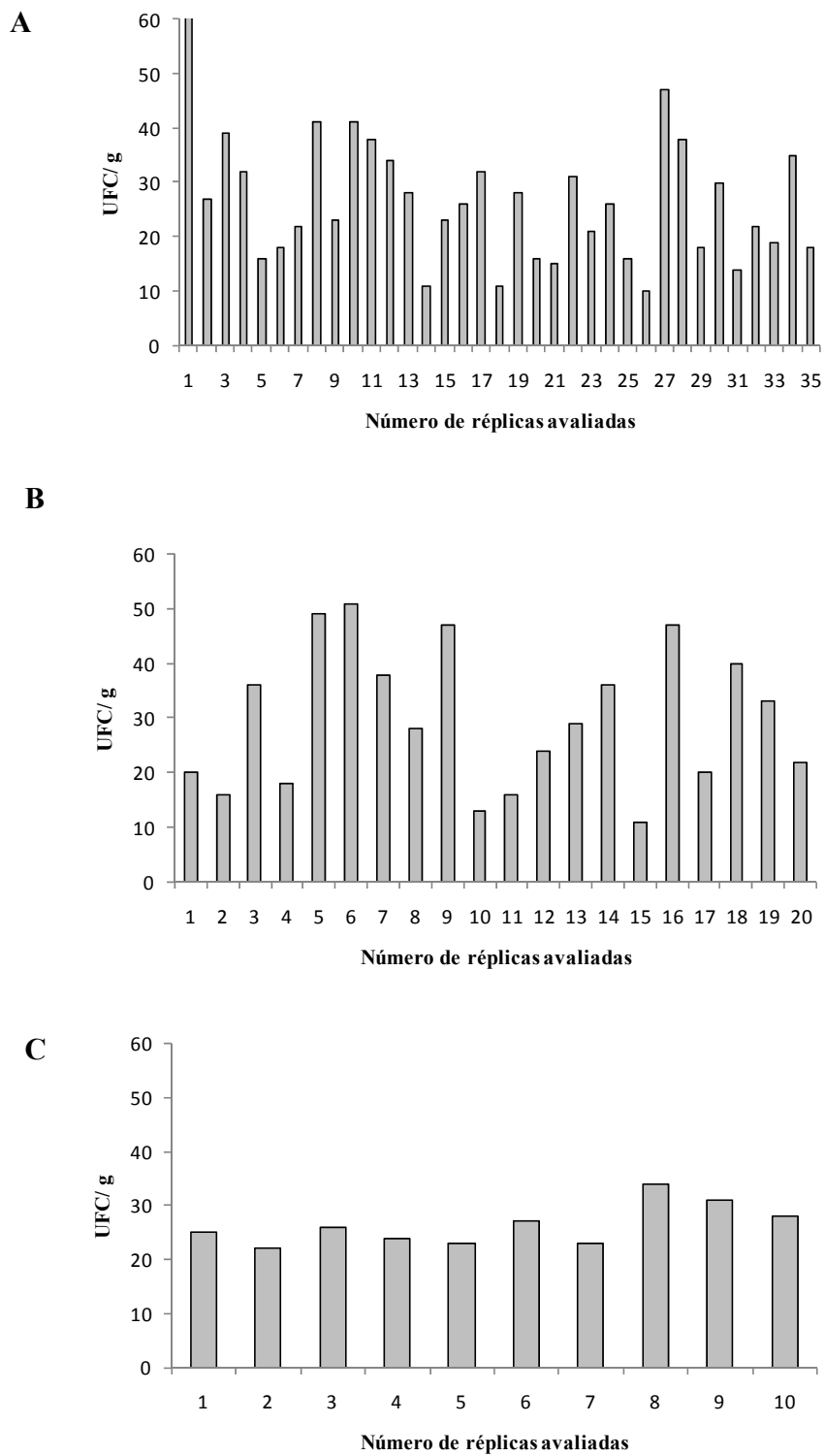


Figura 2- Variação do número de UFC/ g de células de *Salmonella* no MR após o preparo do primeiro lote (**A**), segundo lote (**B**) e terceiro lote (**C**).

A média inicial da contagem de colônias das 35 réplicas do MR preparado no primeiro lote foi de $2,7 \times 10^1$ UFC/ g. A contagem inicial de colônias das 20 réplicas do MR no segundo lote foi de $2,9 \times 10^1$ UFC/ g. Enquanto no terceiro lote esta contagem média em 10 réplicas foi de $2,6 \times 10^1$ UFC/ g. Não houve diferença significativa entre a média de UFC/ g do MR no primeiro e no segundo lote ($p= 0,45$), entre o primeiro e o terceiro lote ($p= 0,87$) e do segundo para o terceiro ($p= 0,42$). A média de UFC/ g dos três lotes de MR preparados está apresentada na Figura 3.

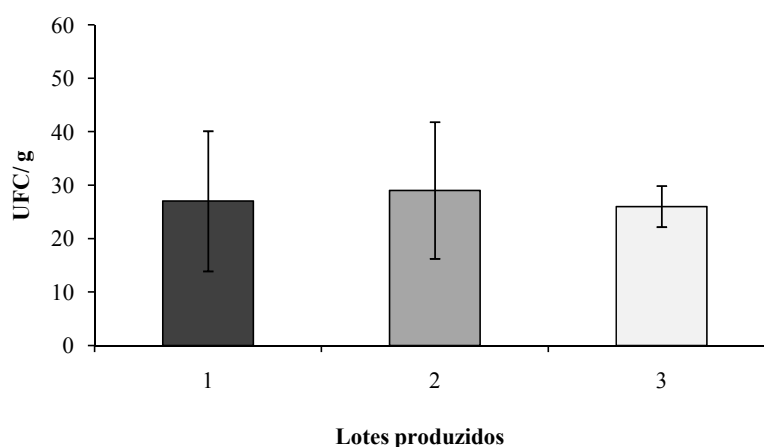


Figura 3- Média de UFC/ g das réplicas avaliadas logo após o preparo do MR com células de *Salmonella* no primeiro lote (1), segundo lote (2) e terceiro lote (3). As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as réplicas de um mesmo lote.

A homogeneidade do MR avaliada pelo teste estatístico de $T^2/(I-1)$, onde I é igual ao número de réplicas avaliadas, apresentou valores de 6,40 para o MR do primeiro lote, 5,52 para o MR do segundo lote e 0,56 para o MR do terceiro lote (Tabela 1). Segundo Heisterkamp *et al.* (1993) *apud* In't Veld *et al.* (1996) para que a variação entre a contagem de UFC/ g do MR tenha uma dispersão semelhante as dos índices de Cochran's é necessário que $T^2/(I-1)$ seja ≤ 2 . Observa-se então que os MRs produzidos no primeiro e segundo lotes não seguem esta distribuição normal e devem ser melhorados quanto a sua homogeneidade. No entanto, o MR do terceiro lote segue os parâmetros descritos acima e, portanto, teve uma homogeneidade aceitável.

A dificuldade no preparo do MR contendo um número baixo de células está associada ao fato de que quanto mais se realiza misturas no MR, maiores são as chances de erro na diluição e dispersão das células de *Salmonella*.

Tabela 1- Somatório dos valores de T2 para o primeiro, segundo e terceiro lotes de MR preparado com um número baixo de células de *Salmonella* no tempo inicial e após 60 dias a 4 °C.

Teste T2	Lotes de MR produzidos					
	1º lote		2º lote		3º lote	
	T0	T60 dias	T0	T60 dias	T0	T60 dias
$\sum T2$	217,75	11,22	104,86	17,23	5,02	17,58
$T2/(I-1)$	6,40	1,25	5,52	1,91	0,56	1,95

A estabilidade do MR contendo número baixo de *Salmonella* avaliada após 60 dias de estocagem a 4 °C variou significativamente entre os lotes de material preparado. Enquanto no primeiro lote a redução da viabilidade celular foi de $2,7 \times 10^1$ UFC/ g para 3,6 UFC/ g representando 86,7% de inativação, no segundo lote a estabilidade foi de $2,9 \times 10^1$ para $1,3 \times 10^1$ UFC/ g uma redução de 55,2% da população de células viáveis e no terceiro lote foi de $2,6 \times 10^1$ UFC/ g para 7,9 UFC/ g uma redução de 69,6% (Figura 4). Estes resultados mostraram uma perda acentuada da viabilidade celular nos lotes de MR estocados a 4 °C. Beckers *et al.* (1985b) que avaliaram as temperaturas de 4 °C, 22 °C e 37 °C para estocagem do MR e verificaram que 4 °C foi suficiente para manter a viabilidade de *Salmonella* por 120 dias. No trabalho citado acima, os autores utilizam o MR acondicionado em cápsulas e com sílica gel para diminuir a reidratação do material na estocagem. Estas diferenças na embalagem e condições de estocagem podem ser usadas para justificar as diferenças de resultados encontrados.

O valor de T2 calculado para as amostras de MR estocadas por 60 dias, a 4 °C foi menor do que 2 (Tabela 1), o que indicou a homogeneidade do MR.

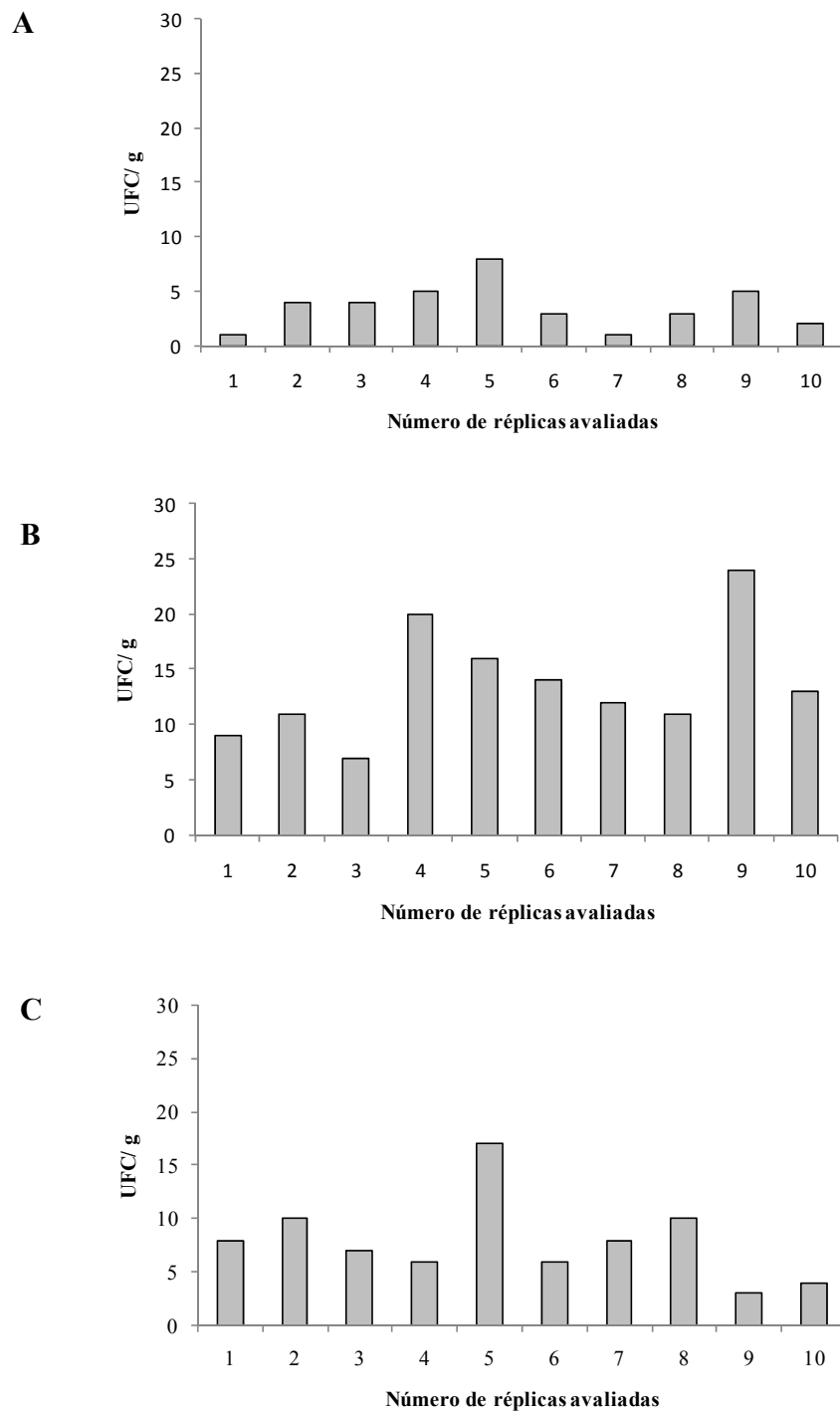


Figura 4- Variação do número de UFC/ g de células de *Salmonella* no MR após 60 dias de estocagem a 4°C, do primeiro lote (A), segundo lote (B) e terceiro lote (C).

Houve diferença significativa entre as médias das 10 réplicas do primeiro e segundo lotes ($p= 0,00002$), primeiro e terceiro lotes ($p= 0,007$) e entre o segundo e o terceiro lotes ($p= 0,011$) (Figura 5).

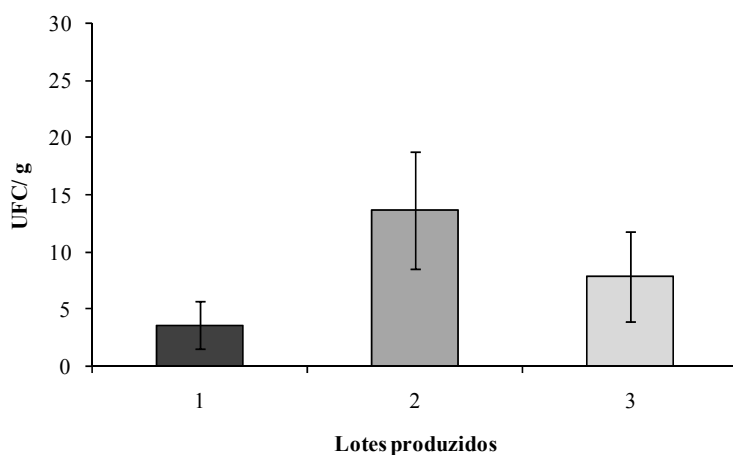


Figura 5- Média de UFC/ g das réplicas avaliadas do MR com células de *Salmonella* no primeiro lote (1), segundo lote (2) e terceiro lote (3), após estocagem por 60 dias a 4 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as réplicas de um mesmo lote.

Fatores como condições de cultivo, meio de desidratação, tempo de estocagem do LPAC e condições de estocagem (JANNING, 1995) podem ter aumentado a sensibilidade de *Salmonella* à estocagem a 4 °C, em ambiente desidratado.

3.3.3- Detecção de *Salmonella* no MR pelo método convencional

Amostras do segundo e terceiro lotes do MR foram analisadas para detectar a presença de *Salmonella* pelo método convencional, com pré-enriquecimento em salina peptonada tamponada e em solução de verde brilhante.

Não foi possível recuperar células viáveis do controle positivo da cultura ativa de *S. Enteritidis* PT4- 578 após pré-enriquecimento em solução de verde brilhante. Este resultado reforçou a constatação de que alguns sorotipos podem não ser recuperados neste caldo e sugere a reavaliação do procedimento de adição de verde brilhante ao caldo de pré-enriquecimento, recomendada pelo Manual bacteriológico analítico (ANDREWS e HAMMACK, 2008). Conforme Riemann (1968) as técnicas para recuperação de *Salmonella* devem ser adaptadas para o tipo de material examinado. Alguns meios podem funcionar melhor que outros em certos aspectos de recuperação de sorotipos particulares de *Salmonella* (AL-HINDAWI e TAHA, 1979). Mas nenhum dos relatos da literatura indica a existência de um meio que funcione maximamente para todos os sorovares (ALBUQUERQUE, ITO e MIYAJI, 2000).

Os resultados demonstraram que por meio da metodologia convencional foi possível detectar células de *Salmonella* no MR quando presentes em baixo número. A etapa de pré-enriquecimento foi fundamental para que células injuriadas fossem recuperadas. In't Veld, Notermans e Van De Berg (1995) relataram o impacto de injúrias subletais às células de microrganismos submetidos a processos de secagem como a liofilização e “spray-drying”, e a influência destas injúrias na recuperação das células, destacando-se a importância da etapa de pré-enriquecimento quando o MR for submetido a metodologia convencional de detecção do microrganismo alvo. Beckers *et al.* (1985b) destacaram ainda o fato de que o uso de células injuriadas, que passaram pelos processos de secagem acima citados no preparo de um MR, nunca poderiam ser representativo de todos os tipos de injúrias pelo quais os microrganismos são submetidos na indústria de alimentos; sendo esta apenas um exemplo de um tipo de injúria que resulta em uma condição fisiológica particular das células bacterianas.

A detecção de *Salmonella* nos lotes de MR pela metodologia convencional, quando estes foram estocados a 4 °C, por 60 dias, foi positiva em oito das 10 réplicas em SPT e nas 10 réplicas em VB do segundo lote, e foi positiva em nove réplicas em SPT e em VB do terceiro lote.

3.3.4- Detecção de *Salmonella* no MR por imunoenálise

A presença de *Salmonella* foi detectada no MR, logo após a mistura, pelo teste imunoenzimático nas amostras pré-enriquecidas em SPT e VB no segundo e terceiro lotes. No MR avaliado após 60 dias de estocagem, a 4 °C, *Salmonella* foi detectada em 85 % das amostras pré-enriquecidas em SPT e em 95 % das amostras em VB, nos lotes avaliados. Assim como nos resultados observados por Reis, Mamizuka e Franco (2002) com amostras de alimento infantil artificialmente contaminado com *Salmonella*, a etapa de pós-enriquecimento em caldo M teve um papel fundamental para detecção de *Salmonella* pelo teste imunoenzimático, pois estimula a formação de flagelos pelos sorotipos de *Salmonella*, e inibe o crescimento de interferentes como *Proteus* sp em função da incubação desse caldo em temperatura elevada.

O controle positivo de *S. Enteritidis* PT4-578 em solução de verde brilhante, que apresentou resultado negativo no método convencional, mostrou resultado positivo pelo método imunoenzimático. Este resultado demonstrou que a detecção de patógenos alimentares pelo método convencional pode dar resultados falso-negativos. Walker *et al.* (2001) relataram quatro resultados falso-negativos para detecção de *Salmonella* em alimentos pelo método convencional, quando comparada a técnica de imunofluorescência VIDAS[®] em amostras coletadas em tanques de leite. Reis, Mamizuka e Franco (2002) encontraram resultados falso-negativos em amostras de alimento infantil contaminado artificialmente quando a quantidade de células de *Salmonella* inoculadas era de 1 ou 10 UFC/ mL.

3.3.5- Detecção de *Salmonella* no MR por PCR

O resultado da detecção de *Salmonella* no MR do segundo e terceiro lotes pela técnica de PCR automatizado BAX System indicou positividade logo após a mistura, em todas as amostras pré-enriquecidas em SPT e em solução VB. Após 60 dias de estocagem a

4 °C, *Salmonella* foi detectada em 65 % das amostras enriquecidas em SPT e em 95 % em VB. Bennett *et al.* (1998) avaliaram a técnica de PCR-BAX para detecção de *Salmonella* em diversos alimentos contaminados artificialmente e encontraram 123 amostras positivas entre 144 amostras contaminadas, o que correspondeu a 85 % de amostras positivas. Maciorowski, Pillai e Ricke (2000) avaliaram a eficiência do método PCR-BAX para detecção de *Salmonella* spp. em ração animal contaminada artificialmente com 40 UFC/ 10 g e observaram 72% de resultados positivos. Segundo estudo desenvolvido pelos fabricantes do kit de PCR-BAX a sensibilidade da técnica é de 98 % e portanto os resultados encontrados foram satisfatórios (USER'S guide: Technical Bulletin, 2008).

A partir da emissão de fluorescência pelo corante “Syber Green”, presente no kit de PCR testado, gráficos foram gerados no programa BAX System. Curvas típicas da amplificação da seqüência alvo de *Salmonella* estão apresentadas nas Figuras 6 e 7. Na Figura 8 tem-se o resultado tipicamente negativo para o patógeno em questão.

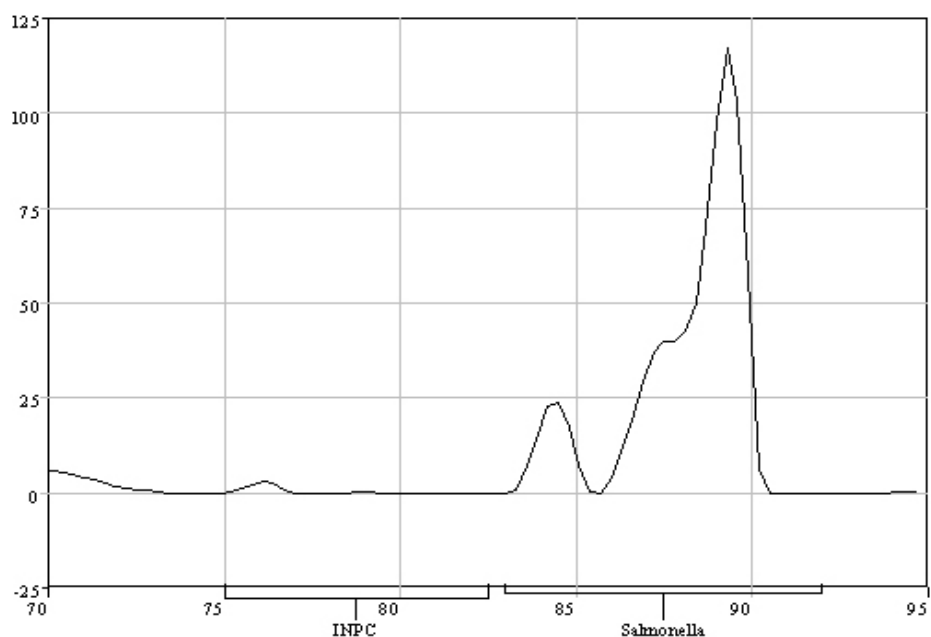


Figura 6- Curva típica de resultado fortemente positivo para presença de *Salmonella* na amostra pelo método de PCR automatizado BAX System. Presença de três picos de amplificação entre 84 e 92°C. Quando o nível de *Salmonella* numa amostra é muito alta, os picos a 88 e 90 °C podem se fundir, de maneira que só é possível ver dois picos distintos. Neste

caso, o pico fundido é muito grande e o pico do controle será muito pequeno ou ausente.
Fonte: USER'S guide: BAX™ for screening *Salmonella*, 2008.

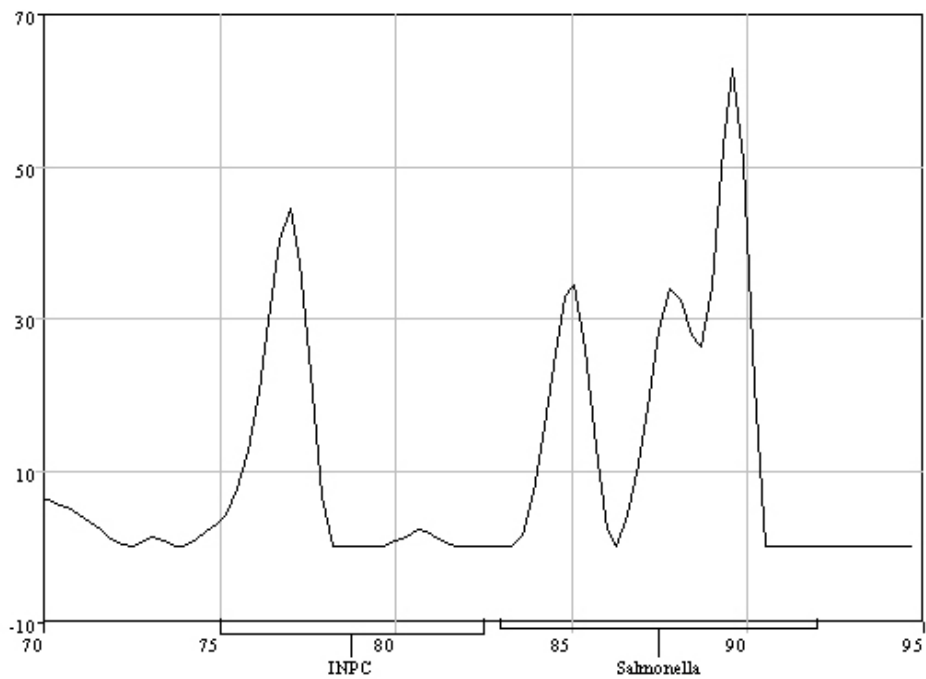


Figura 7- Curva típica de resultado moderadamente positivo para presença de *Salmonella* na amostra pelo método de PCR automatizado BAX System. Presença de três picos de amplificação entre 84 e 92°C. Os picos a 88 e 90 °C podem se fundir, de maneira que só é possível ver dois picos distintos. Neste caso haverá um aumento no tamanho do pico do controle. Fonte: USER'S guide: BAX™ for screening *Salmonella*, 2008.

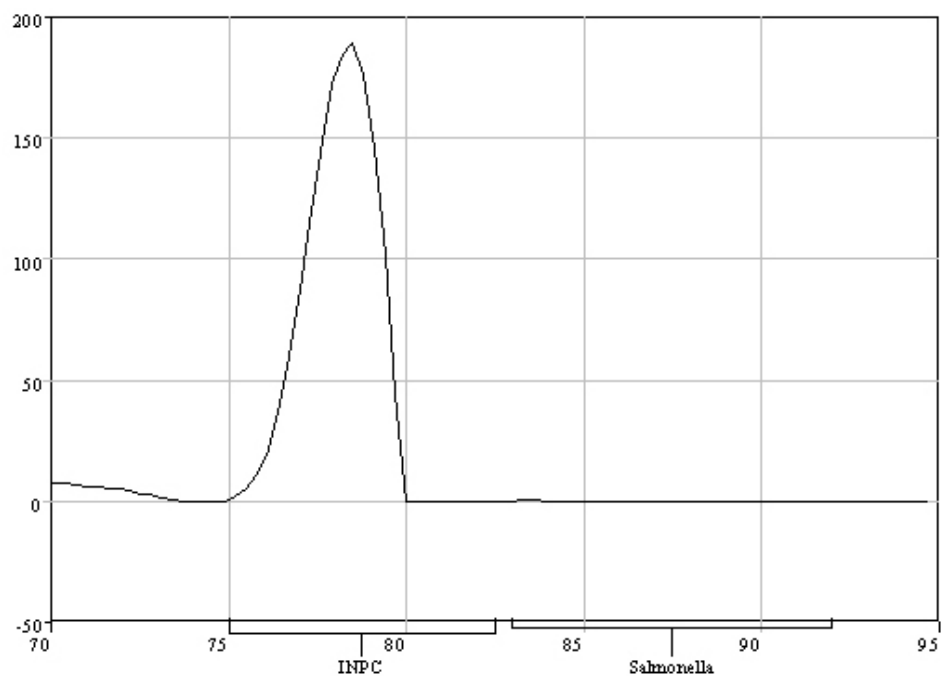


Figura 8- Curva típica de resultado negativo para presença de *Salmonella* na amostra pelo método de PCR automatizado BAX System. Sem picos da bactéria alvo. Grande pico do controle presente no kit. Em alguns casos poderão aparecer picos não-específicos muito pequenos numa variação de temperatura entre 84 e 92 °C, mas eles não aparecerão como os descritos para o resultado positivo. Fonte: USER'S guide: BAX™ for screening *Salmonella*, 2008.

3.3.6- Comparação entre as metodologias de detecção de *Salmonella*

Os resultados obtidos na pesquisa de *Salmonella* quando comparadas a metodologia convencional, imunoenálise e PCR- BAX estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Número de amostras positivas para *Salmonella* no MR detectadas pelos métodos Convencional, VIDAS[®] e PCR- BAX.

Número de amostras positivas - T0							
MR avaliado	Réplicas avaliadas por lote	Método Convencional		Imunoenálise		PCR - BAX	
		SPT (Total de 10)	VB (Total de 10)	SPT	VB	SPT	VB
2º lote	20	10	10	10	10	10	10
3º lote	20	10	10	10	10	10	10
Número de amostras positivas - após 60 dias							
MR avaliado	Réplicas avaliadas por lote	Método Convencional		Imunoenálise		PCR - BAX	
		SPT (Total de 10)	VB (Total de 10)	SPT	VB	SPT	VB
2º lote	20	8	10	8	10	6	10
3º lote	20	9	9	9	9	7	9

A metodologia convencional e a técnica de imunoenálise VIDAS[®] tiveram concordância em todos os resultados. Estes resultados corroboram com os obtidos por Walker *et al.* (2001) que observaram mais de 97,5 % de concordância entre os dois métodos na detecção de *Salmonella* em leite. Feldsine, Falbo-Nelson e Hustead (1992) encontraram concordância de 97,2 % entre o teste imunoenzimático tipo sanduíche e o método convencional. Eckner *et al.* (1992) encontraram 96,7 % de concordância entre o método de cultivo convencional e outro teste imunoenzimático (*Salmonella*-Tek) na análise

de amostras de alimentos contaminadas. Estes resultados discordam dos encontrados por Von Ruckert (2006), que comparou a detecção de *Salmonella* pelo método imunológico VIDAS® e método convencional em carcaças de frango na linha de abate e encontrou 22,8 % e 8,1 % de frequência de detecção, respectivamente. Por outro lado, Raes e Henken (2000) ao utilizar amostras fecais provenientes de galinhas, frangos, bezerros e vacas leiteiras, encontraram cerca de 40% de resultados falso-positivos pelo sistema imunológico VIDAS®, que não puderam ser confirmados pelo método convencional.

Quando se comparou a técnica de PCR-BAX à metodologia convencional, verificou-se que por meio a técnica de PCR foi possível de detectar a presença de *Salmonella* em 90 % das amostras, isto é, 72 das 80 amostras analisadas. No entanto, foram encontrados 5 % de resultados discordantes da metodologia convencional. Estes resultados corroboram com os encontrados por Dickel *et al.* (2005), que observaram maior eficiência da metodologia convencional comparada à técnica de PCR. No entanto, contrastam com os resultados encontrados por Von Ruckert *et al.* (2008), que observaram maior sensibilidade pela técnica de PCR comparada ao método imunológico e a metodologia convencional para a detecção do patógeno. Por outro lado, Ellingson *et al.* (2004) relataram que a técnica de PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* apresentou 100 % de correlação com as técnicas de ensaio imunológico e com o método convencional.

O teste estatístico de Qui-quadrado (X^2) foi aplicado sobre o total de amostras com resultados positivos nos métodos avaliados, a partir da soma dos resultados positivos dos caldos de pré-enriquecimento, por lote e tempo de estocagem (Tabela 3).

Tabela 3- Número total de amostras positivas detectadas pelo método Convencional, VIDAS® e PCR.

Material	Nº amostras testadas	Nº total de amostras positivas		
		Convencional	VIDAS®	PCR- BAX
MR	80	76	76	72

A partir desses valores foram confeccionadas tabelas 2 x 2 para comparar, individualmente, os métodos rápidos de detecção do patógeno, VIDAS[®] e PCR, com o método convencional (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Tabela 2 x 2: comparação da detecção de *Salmonella* pelo método VIDAS[®] e método Convencional (padrão-ouro).

		Método convencional		
		Positivo	Negativo	Total
VIDAS[®]	Positivo	76	0	76
	Negativo	0	4	4
	Total	76	4	80

Tabela 5- Tabela 2 x 2: comparação da detecção de *Salmonella* pelo método de PCR automatizado BAX e método Convencional (padrão-ouro).

		Método convencional		
		Positivo	Negativo	Total
PCR- BAX	Positivo	72	0	72
	Negativo	4	4	8
	Total	76	4	80

Na comparação entre a metodologia convencional e o método imunológico VIDAS[®] foram encontrados resultados iguais do número de amostras positivas e amostras negativas. Entretanto, o mesmo não aconteceu na comparação do método convencional com o método de PCR, que detectou menos amostras positivas.

O teste estatístico de Qui-quadrado resultou em 60,33 com valor de $p < 0,001$ quando se comparou o método imunológico em relação ao método convencional padrão, e valor de 28,10 com $p < 0,001$ para o método de PCR- BAX em relação ao convencional (Tabela 6). Como o valor de “p” foi significativo, rejeitou-se a hipótese H_0 que estabelece a

não associação entre as variáveis. Portanto, houve associação entre os métodos convencional, VIDAS® e PCR-BAX, fato este justificado pela congruência dos resultados encontrados.

Tabela 6- Porcentagem de concordância entre os métodos testados, índice Kappa, valor da significância de Kappa (*p*) e valor de Qui-quadrado com correção de Yates.

Métodos	Concordância (%)	Kappa	<i>p</i> Kappa	X²
VIDAS®	100%	1	0,000000	60,33
PCR- BAX	95%	0,64	0,000000	28,10

X² = valor de Qui-quadrado com a correção de Yates

Índice Kappa = valor indicativo de concordância entre metodologias

Para comparar os resultados obtidos por diferentes metodologias em relação a um teste padrão-ouro foi realizado o cálculo do índice de Kappa (Tabela 6), que forneceu uma idéia do quanto as observações se afastaram daquelas esperadas, fruto do acaso, indicando assim, o quão legítimas são as interpretações. Foi verificada, inicialmente, a porcentagem de concordância esperada pelo acaso e, posteriormente, a porcentagem observada, o que resultou no valor do índice de Kappa, que variou de zero a um, sendo que o zero representa a ausência de concordância e o 1 a concordância perfeita.

Outra maneira de comparação de métodos é através do cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, que estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, com os respectivos intervalos de confiança, calculados no programa Epiinfo.

Métodos	N° amostras positivas	N° amostras negativas	Índices			
			Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
VIDAS®	76	4	1 (100%) IC 94,0- 100,0	1 (100%) IC 39,6- 100,0	1 (100%) IC 94,0- 100,0	1 (100%) IC 39,6- 100,0
PCR- BAX	72	8	0,94 (94,7%) IC 86,4- 98,3	1 (100%) IC 39,6- 100,0	1 (100%) IC 93,7- 100,0	0,50 (50%) IC 17,4- 82,6

VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo

IC = intervalo de confiança com probabilidade de 95 %

A sensibilidade diz respeito à capacidade do teste em detectar amostras positivas e os resultados indicaram maior sensibilidade do método imunológico VIDAS® em relação ao método de PCR-BAX (Tabela 7). Os métodos rápidos avaliados apresentaram mesma especificidade, o que indica uma mesma capacidade de detecção de amostras verdadeiramente negativas. O valor preditivo positivo (VPP) também foi igual para ambos os métodos rápidos e indica a porcentagem de amostras avaliadas como verdadeiramente positivas dentre as consideradas como positivas. Os valores preditivos negativos (VPN), que representam o número de resultados verdadeiramente negativos dentre os considerados negativos, foi menor quando se utilizou o método de PCR-BAX, o que indica maior incidência de resultados falso-negativos nesta análise.

Embora o método de PCR seja relatado por alguns autores como sendo mais sensível (MANDRELL e WACHTEL, 1999; MYINT *et al.*, 2006; MALORNY *et al.*, 2007), resultou em 5 % de resultados falso-negativos, o que é significativo na análise de *Salmonella* em alimentos devido a sua patogenicidade. Os resultados falso-negativos foram encontrados nas amostras de MR após 60 dias de estocagem, a 4 °C, quando se detectou número de células viáveis em torno de 10 UFC/g. A não detecção de *Salmonella* presente no alimento pode resultar em comprometimento da saúde do consumidor, além de acarretar gastos com saúde pública e não conformidade para o laboratório analisador. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Franchin *et al.* (2006), que compararam a detecção de *Salmonella* pelos métodos PCR-BAX e convencional modificado com Rappaport Vassiliadis semi-sólido modificado (MRVS) em carcaças de frango e carne de porco. Esses autores encontraram 17 % de resultados falso-negativos na análise das carcaças e 10 % em carne de porco ao utilizarem a técnica de PCR-BAX. Entretanto, não foi verificada diferença significativa entre os métodos, que tiveram 95 % de concordância.

Teoricamente, os resultados encontrados aqui podem ser explicados pelo boletim técnico fornecido pelo fabricante do kit BAX, que utiliza estatisticamente a amostragem de Poisson para calcular a porcentagem de resultados falso-negativos, ou ainda resultados decorrentes de erro do operador, produtos inespecíficos durante a execução do PCR, falha na extração do DNA e no uso de sub-amostras (USER'S guide: Technical Bulletin, 2008).

Verificou-se que os métodos rápidos testados, VIDAS[®] e PCR-BAX, combinaram rapidez e praticidade na análise de *Salmonella* no MR. O método convencional de detecção *Salmonella* levou de cinco a sete dias para confirmação dos resultados, enquanto o teste imunoenalítico VIDAS[®] demandou 48 h para enriquecimento da amostra e 45 minutos de análise no aparelho, a custo acessível. O PCR automatizado BAX System, alternativamente, também economizou tempo de análise, reduziu os erros no preparo da reação de PCR e interpretação dos resultados. Outra vantagem da técnica são os tabletes liofilizados que acompanham o kit, com todos os componentes necessários para a reação de PCR, o que evitou riscos de contaminação cruzada. O BAX System forneceu o resultado em, aproximadamente, 32 h, sendo 24 horas necessárias ao pré-enriquecimento. Outro aspecto positivo desta técnica é a praticidade de analisar 96 amostras por vez, não necessariamente para a pesquisa de um mesmo microrganismo alvo, isto é, podem ser realizadas análises distintas concomitantemente, desde que as faixas de temperatura de amplificação da seqüência alvo de DNA dos microrganismos sejam coincidentes.

3.4 - CONCLUSÕES

Os três lotes de MR contendo baixo número de células viáveis de *Salmonella* não apresentaram diferença significativa entre a média de UFC/ g indicando repetibilidade no preparo do material. Entretanto, a homogeneidade e a estabilidade do MR produzido não atenderam aos parâmetros estabelecidos por instituições produtoras de MR internacionais, indicando a necessidade de mais estudos para se obter MR homogêneo e estável.

O método convencional e o de imunoanálise para determinação da presença de *Salmonella* apresentaram 100 % de concordância na detecção deste patógeno nos lotes de MR avaliados. Entretanto, a técnica de PCR automatizado apresentou 95 % de concordância com o método convencional e mostrou-se menos sensível na detecção de *Salmonella* após 60 dias de estocagem do MR, com 5 % de resultados falso-negativos.

3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Comparative study of different culture media for *Salmonella* recovery in feedstuffs and feeds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395962000000100012&lng=en&enrm=iso>, acessado em 27 de maio de 2008.
- AL-HINDAWI, N.; TAHA, R. R. *Salmonella* species isolated from animal feed in Iraq. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 676- 679, 1979.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Chapter 5- *Salmonella*, **Bacteriological Analytical Manual Online/ Food and Drug Administration - BAM/ FDA**, 2007. Disponível em: <<http://www.foodinonet.com/publication/fdaBAM.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2008.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official method 2004.3 *Salmonella* in Foods. Enzyme-linked Fluorescent Assay (ELFA) Screening Method. In: **Official methods of analysis of AOAC international**, Maryland, USA, 18^a ed., cap. 17, p. 197- 199, 2005.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2003.09 *Salmonella* in selected foods. BAX® automated system. **Official methods of analysis of AOAC international**, Maryland, USA, 18^a ed., cap. 17, p. 194- 196, 2006.
- BECKERS, H. J.; VAN LEUSDEN, F. M.; MEIJSEN, M. J. M.; KAMPELMACHER, E. H. Reference material for the evaluation of the standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 507- 512, 1985b.
- BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437- 441, 1998.
- BOHAYCHUK, V. M.; GENSLER, G. E.; MCFALL, M. E.; KING, R. K.; RENTER, D. G. A real-time PCR assay for detection of *Salmonella* in a wide variety of food and Food-animal matrices. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1080- 1087, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, 26 ago. 2003. Manual de Métodos de Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Brasília D.F.: **Diário Oficial da União**, nº 181, seção 1, p. 14- 51, 2003.
- CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 373- 377, 2005.
- CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; IKUNO, A. A.; BURGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Veterinary Science**, v. 81, p.340- 344, 2006.

- DE MÉDICI, D.; CROCI, L.; DELIBATO, E.; PASQUALE, S. D.; FILETICI, E.; TOTI, L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with Syber Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3456- 3461, 2003.
- DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F. M.; DUARTE, L. F. Microbiologia convencional, ELISA, e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 79- 85, 2005.
- ECKNER, K. F.; MCIVER, R.; LEPPER, W. A.; FANNING, L.; CURIALE, M. S.; FLOWERS, R. S.; ROBISON, B. Use of an elevated temperature and novobiocina in a modified enzyme-linked immunosorbant assay of the improved recovery of *Salmonella* from foods. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p. 758- 762, 1992.
- ELLINGSON, J. L. E.; ANDERSON, J. L.; CARLSON, S. A.; SHARMA, V. K. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 51- 57, 2004.
- EPIINFO version 6.04: **a world processing, database and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1993. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/>>. Acesso em: 20 maio 2008.
- FELDSINE, P. T.; FALBO-NELSON, M. T.; HUSTEAD, D. L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, n. 6, p. 1032- 1044, 1992.

- FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 977- 978, 2001.
- HEISTERKAMP, S. H.; HOEKSTRA, J. A.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MOOIJMAN, K. A.; IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. H. W. (1993). Statistical analysis of certification trials for microbiological reference materials. In: IN'T VELD, P.H.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MAIER, E. A. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 496- 504, 1996.
- IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. H. W.; VAN DE BERG, M. Potencial use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors: a collaborative study. **Food Microbiology**, v. 12, p. 125- 134, 1995.
- IN'T VELD, P. H.; VAN STRIJP-LOCKEFEER, N. G. W. M.; HAVELAAR, A. H.; MAIER, E. A. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p.496- 504, 1996.
- JANNING, B.; IN'T VELD, P. H.; MOOIJMAN, K. A.; HAVELAAR, A. H. Development, production and certification of microbiological reference material. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 240- 245, 1995.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, Washington DC: American Public Health Association- APHA, 4^a ed., 2001.

- LI, Y.; MUSTAPHA, A. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 508- 512, 2002.
- MACIOROWSKI, K. G.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Efficacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. In animal feeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 710- 718, 2000.
- MALORNY, B., BUNGE, C.; HELMUTH, R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiology Methods**, v. 70, p. 245-251, 2007.
- MANDRELL, R. E.; WACHTEL, M. R. Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 273-278, 1999.
- MANUAL do kit VIDAS[®]: ref. 30 702. Marcy-I'Etoile: BIOLAB- MÉRIEUX, 2007.
- MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocolo on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599- 604, 2006.
- RAES, M.; HENKEN, A. M. **Report on the fourth workshop organised by CRL-*Salmonella***. Report 284500 015, Bilthoven: RIVM, 2000.
- REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B. D. G. M. Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p.105- 110, 2002.

- ROUQUAIROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e saúde**. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 5ª ed., 1999.
- SCHRANK, I. S.; MORES, M. A. Z.; COSTA, J. L. A.; FRAZZON, A. P. G.; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C. Influence of enrichment media and application of PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 45- 53, 2001.
- SCHULTEN, S. M.; IN'T VELD, P. H.; GHAMESHLOU, Z.; SCHIMMEL, H.; LINSINGER, T. **The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella* Typhimurium and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk powder**. CRM 507R. EUR 19622. BCR information reference materials, 2000.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 3ª ed., p. 253- 285, 2007.
- USER'S guide: **BAX™ for screening *Salmonella***. Wilmington, DE: Qualicon™, L. L. C., 2008. CD-ROOM.
- USER'S guide: **Technical Bulletin**. Wilmington, DE: Qualicon™, L. L. C., 2008. CD-ROOM.
- UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 386-391, 2003.
- VON RÜCKERT, D. A. S. Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoenálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de

Salmonella sp. em frangos durante o abate. **Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária**. Viçosa- MG. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006.

VON RÜCKERT, D. A. S.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; MORAES, M. P.; SILVA JUNIOR, A.; NERO, L. A. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* spp. monitoring in chicken. **Journal of Rapid Methods e Automation in Microbiology**, v. 16, p. 185-195, 2008.

WALKER, R. L.; KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food microbiology**, v. 67, p. 123- 129, 2001.

WANG, S. J.; YEH, D. B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella enteritidis* in foods and faecal samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 422- 427, 2002.

WANG, H.; LI, Y.; SLAVIK, M. PCR-based fluorescent method for rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in poultry samples. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 10, p. 86- 92, 2002.

WHYTE, P.; MC GILL, K.; COLLINS, J. D.; GORMLEY, E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 53- 60, 2002.

ANEXO
CAPÍTULO 2

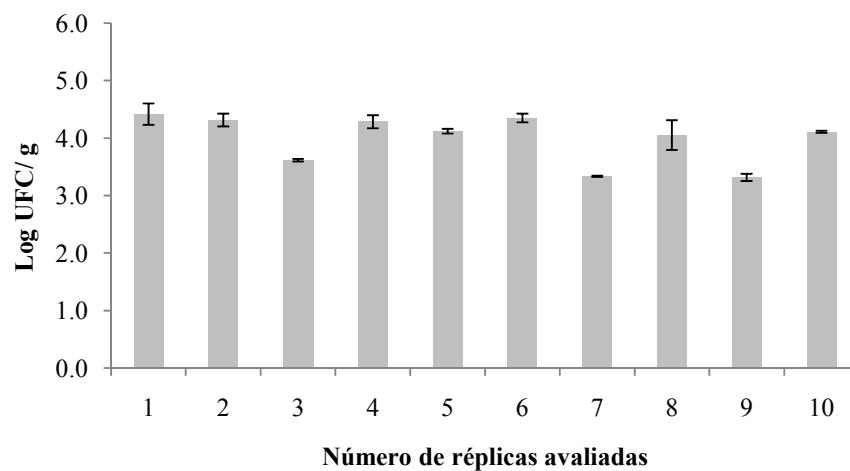


Figura 2.1- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 30 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

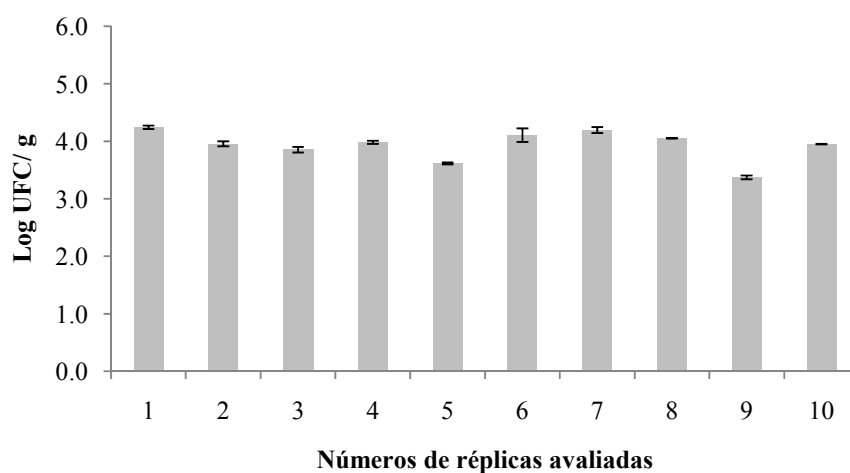


Figura 2.2- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 30 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

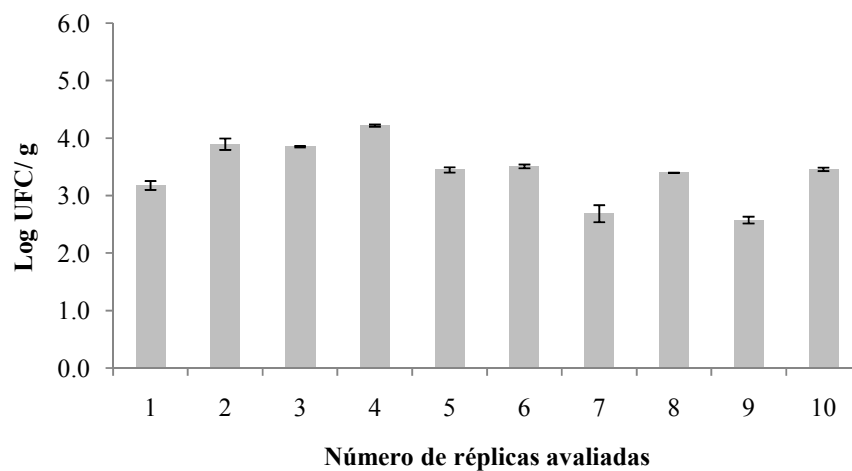


Figura 2.3- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 60 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/g entre as duplicatas de uma réplica.

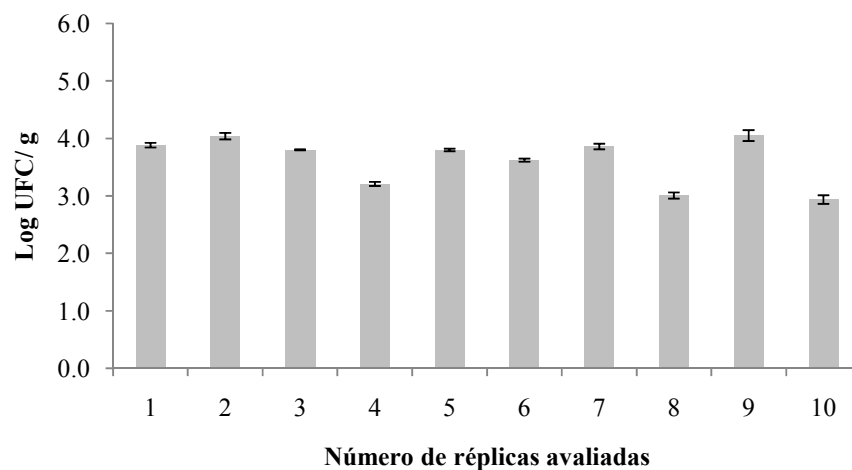


Figura 2.4- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 60 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

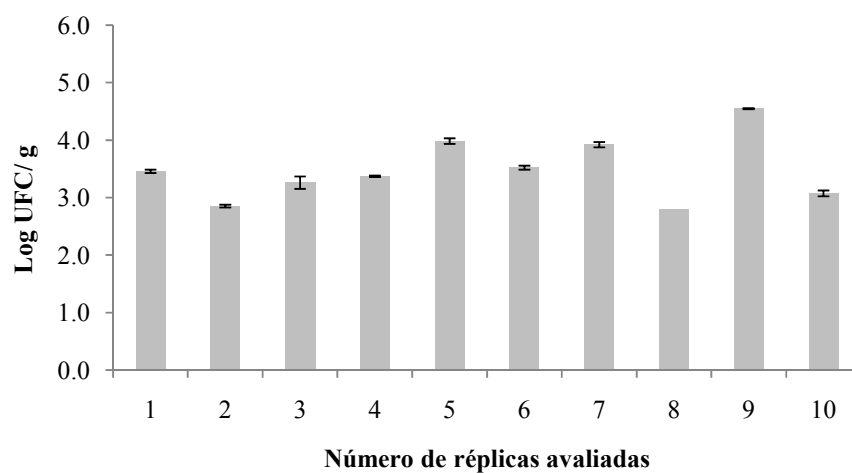


Figura 2.5- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 90 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

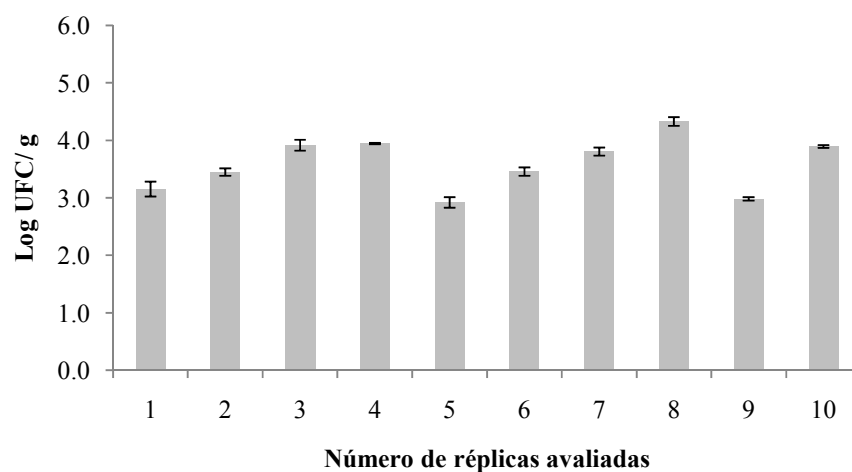


Figura 2.6- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 90 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

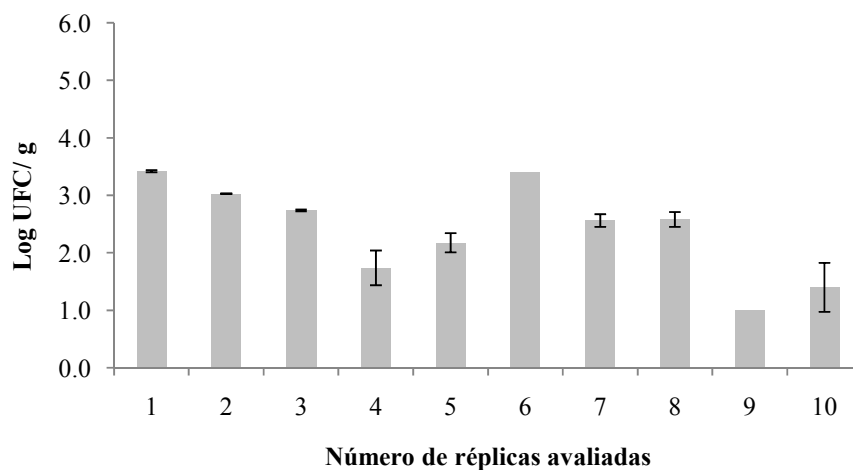


Figura 2.7- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 150 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

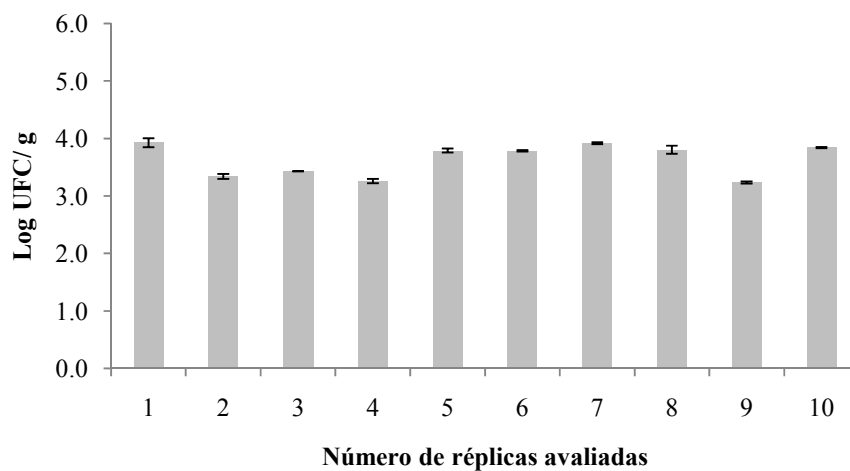


Figura 2.8- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 150 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

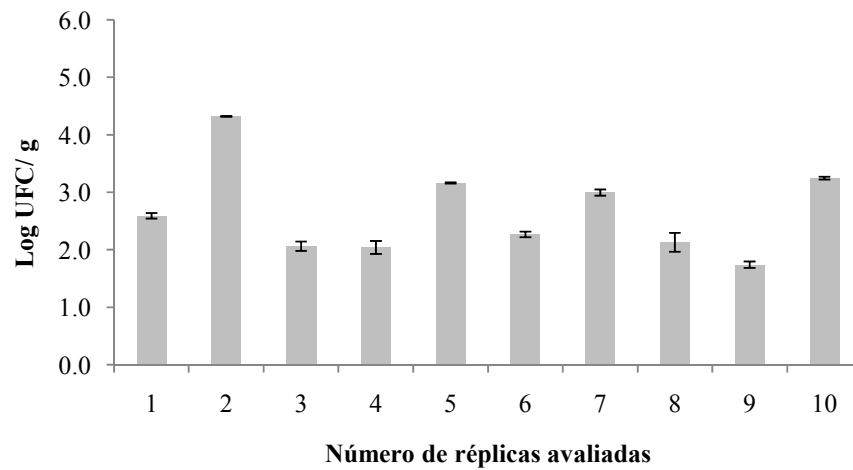


Figura 2.9- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 210 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

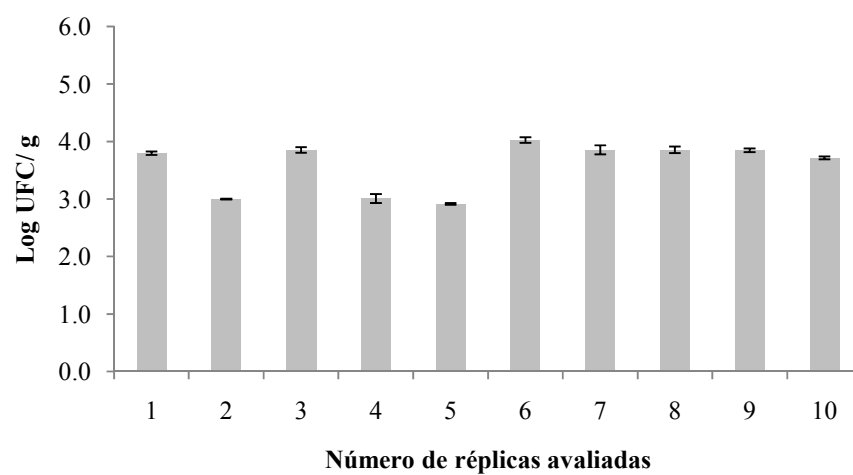


Figura 2.10- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 210 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

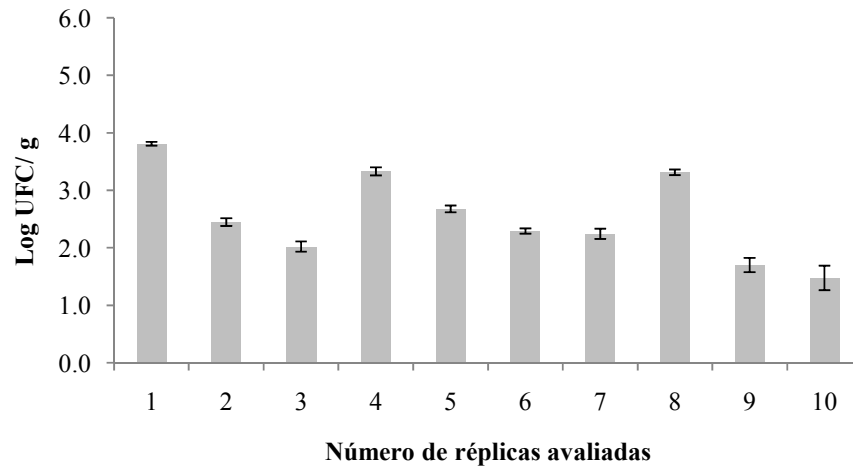


Figura 2.11- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* sem estresse nutricional após 240 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.

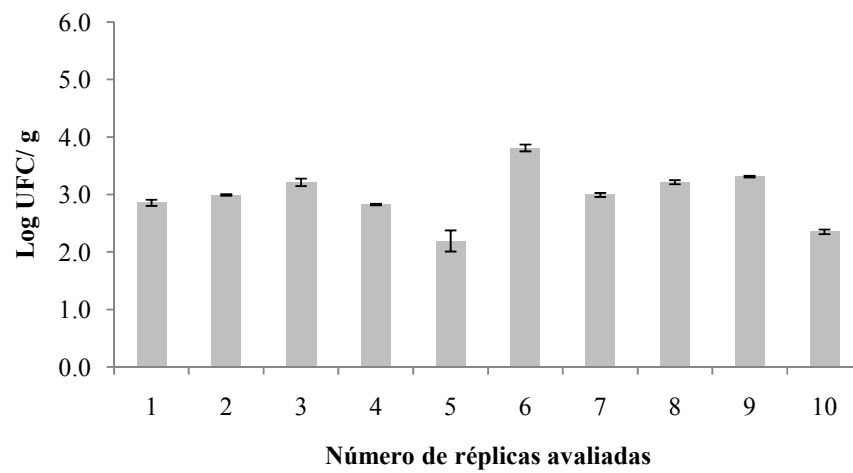


Figura 2.12- Variação no logaritmo de UFC/g do MR com células de *Salmonella* com estresse nutricional após 240 dias de estocagem a -20 °C. As barras de erro representam o desvio padrão do número de UFC/ g entre as duplicatas de uma réplica.