UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de *Salmonella* spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso

Mario Killner

Tese para obtenção do grau de doutor

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K48p	<p>Killner, Mario</p> <p>Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de <i>Salmonella</i> spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso / Mario Killner. -- São Paulo, 2008. 1v.(várias paginações)</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo</p> <p>1. Microbiologia de alimentos 2. Microbiologia analítica I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.</p> <p>664.07 CDD</p>
------	---

Mario Killner

Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de *Salmonella* spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso

**Comissão Julgadora da Tese para
obtenção do grau de Doutor**

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
1º Examinador

Profa. Dra. Ivone Delazari
2º Examinador

Profa. Dra. Mariza Landgraf
3º Examinador

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
4º Examinador

São Paulo, 20 de junho de 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Mario Killner no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de junho de 2008, no(a) Auditório Paulo de C. Ferreira realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Mario Killner, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de Salmonella spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco	Presidente	FCF - USP	APROVADO
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto	Titular	FCF - USP	Aprovado
Mariza Landgraf	Titular	FCF - USP	Aprovado
José Paes de Almeida Nogueira Pinto	Titular	UNESP - Externo	Aprovado
Ivone Delazari	Titular	Externo	Aprovado
Resultado Final: <i>Aprovado</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Monica Dealis Perussi *Monica Dealis Perussi*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 20 dias do mês de junho de 2008.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Mariza Landgraf
Mariza Landgraf

José Paes de Almeida Nogueira Pinto
José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Ivone Delazari
Ivone Delazari

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 20/06/2008

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à

Sandra, Fabio e Debora Killner,

minha família,

também a

Aline A. Killner e Denis Strum,

Ela recém chegada e bem vinda e ele, recém chegando.

Francisco Killner, in memoriam e Chipena Killner,

meus pais,

e à equipe amiga da SFDK.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Bernadette D. G. M.. Franco pela competência e entusiasmo com que orientou este trabalho.

Às Prof^{as} Maria Teresa Destro e Mariza Landgraf pelas palavras sempre enriquecedoras.

À Prof^a Marilene De Vuono Camargo Penteado pela estímulo, realizador.

À Janaína Thais Lopes, que com seu comprometimento, muito colaborou na realização desta tese.

A Diffchamb, pela gentileza em fornecer o Kit TRANSIA PLATE SALMONELLA GOLD.

À SFDK pelo fornecimento dos demais KITS utilizados e ao seu pessoal, pelo apoio e colaboração.

Ao Jorge Alves de Lima e a Elaine Midori Ychico, da Secretaria de pós graduação da FCFUSP, pela “paciência” com o aluno e o carinho com que conduzem as atividades da pós graduação.

A Leila Bonadio, da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela gentil revisão da lista de referências bibliográficas.

SUMÁRIO

	Resumo	
	Abstract	
1.	Introdução	01
2.	Objetivos	31
3.	Materiais e Métodos	32
3.1.	Amostras de alimentos analisadas	32
3.2.	Metodologias analíticas	34
3.2.1.	Preparo das amostras (pré-enriquecimento)	34
3.2.2.	Metodologia ISO 6579:2002	34
3.2.3.	BAX (Qualicon – DuPont)	35
3.2.4.	Tecra Unique Salmonella (Tecra)	37
3.2.5.	VIP Salmonella (Biocontrol)	38
3.2.6.	Transia Plate Salmonella Gold (Diffchamb)	40
3.2.7.	VIDAS Salmonella (SLM) (Biomerieux)	42
3.2.8.	Singlepath Salmonella (Merck)	43
3.2.9.	1-2 Test (Biocontrol)	44
3.3.	Determinação do limite de detecção	46
3.3.1.	Preparo das culturas para inoculação experimental	46
3.3.2.	Inoculação experimental	47
4.	Resultados	49
5.	Discussão	70
6.	Conclusões	86
7.	Referências Bibliográficas	88
	Anexos	

TABELAS

Tabela 1-	Número total de surtos, casos e óbitos por doenças causadas por alimentos contaminados com diferentes agentes bacterianos nos Estados Unidos, no período de 1998 a 2002, com etiologia conhecida	15
Tabela 2-	Números de surtos de salmoneloses reportados por mês de ocorrência nos Estados Unidos no período de 1998 a 2002	16
Tabela 3-	Kits para detecção de <i>Salmonella</i> spp em alimentos com status de “Performance Tested Method” (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY AOAC, 2008)	18
Tabela 4-	Kits para detecção de <i>Salmonella</i> spp em alimentos, disponíveis no mercado e seus reconhecimentos (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2003)	22
Tabela 5-	Distribuição dos grupos de amostras analisadas	32
Tabela 6-	Métodos e número de amostras de alimentos utilizados no estudo	33
Tabela 7-	Positividade encontrada para <i>Salmonella</i> spp nos diferentes grupos de amostras analisadas pela metodologia ISO 6579:2002	53
Tabela 8-	Relação das amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp pela metodologia ISO 6579:2002 e os resultados obtidos pelos demais métodos avaliados	54
Tabela 9-	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp nas amostras analisadas sem contaminação experimental	59
Tabela 10-	Porcentagem de concordância dos resultados presuntivos positivos para <i>Salmonella</i> spp nos métodos rápidos avaliados, em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002, nos diferentes grupos de amostras analisadas	60

Tabela 11-	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em frango, ovos e produtos avícolas	61
Tabela 12-	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em farelo de soja	62
Tabela 13-	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em carnes e produtos cárneos	63
Tabela 14-	Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em outros produtos analisados	64
Tabela 15-	Resultados falso-negativos para <i>Salmonella</i> spp nos métodos rápidos avaliados, em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002, nos diferentes grupos de amostras analisadas	65
Tabela 16-	Detecção de <i>Salmonella</i> spp por diferentes métodos, em amostras de carne, leite em pó integral e gelatina granulada, artificialmente contaminadas com um pool de cepas de <i>Salmonella</i> Enterica em 5 níveis de inóculo	66
Tabela 17-	Resultados analíticos consolidados dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp em amostras de carne, leite em pó integral e gelatina granulada artificialmente contaminadas com um “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> Enterica em 5 níveis de inóculo	68
Tabela 18-	Porcentagem de concordância dos resultados presuntivos positivos para <i>Salmonella</i> spp nos métodos rápidos avaliados em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002 em amostras de alimentos sem contaminação experimental e amostras de alimentos artificialmente contaminadas	69

FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma do método para detecção de <i>Salmonella</i> spp em alimentos segundo a ISO 6579:2002	02
Figura 2-	Casos de salmoneloses em seres humanos, atribuídos à carne, frango e ovos, ocorridos nos Estados Unidos entre 1998 e 2003 (UNITED STATES, 2008)	16
Figura 3-	Foto ilustrativa do equipamento BAX System	35
Figura 4-	Esquema do ensaio pelo método BAX System	36
Figura 5-	Foto ilustrativa dos blocos aquecedores.....	37
Figura 6-	Foto ilustrativa do Kit TECRA UNIQUE SALMONELLA	37
Figura 7-	Esquema analítico do método VIP Salmonella	39
Figura 8-	Fotos ilustrativas da placa com micro-poços (esquerda) e do equipamento Transia Elisamatic II (direita)	40
Figura 9-	Foto ilustrativa do aparelho MiniVIDAS (ao fundo) e das barretes ..	43
Figura 10-	Foto ilustrativa do kit Singlepath Salmonella	43
Figura 11-	Esquema analítico do método 1-2 Test	45
Figura 12-	Esquema ilustrativo do tempo necessário para realização das metodologias utilizadas	85

ANEXOS

- Anexo 1- Relação de amostras e resultados analíticos obtidos na pesquisa de *Salmonella* spp por diferentes métodos (kits), em diferentes matrizes naturalmente contaminadas
- Anexo 2- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: BAX System
- Anexo 3- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: TECRA Unique Salmonella
- Anexo 4- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: VIP Salmonella
- Anexo 5- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: TRANSIA PLATE Salmonella Gold
- Anexo 6- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: VIDAS (SLM) Salmonella
- Anexo 7- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: Singlepath Salmonella
- Anexo 8- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante: 1-2 Test

RESUMO

Salmonella spp é um dos microrganismos patogênicos de relevância em alimentos. Sua detecção em alimentos por metodologia de cultura é trabalhosa e demorada, o que explica a grande variedade de sistemas automatizados e kits para detecção rápida desse patógeno existentes no mercado. Muitos desses métodos alternativos são validados por organizações internacionalmente reconhecidas, mas tais validações têm sido efetuadas em condições laboratoriais artificiais e com matrizes alimentares experimentalmente contaminadas, dificilmente refletindo a realidade de um laboratório de rotina de análises microbiológicas de alimentos. Nesse trabalho, avaliou-se o desempenho de sete métodos rápidos alternativos genotípicos e imunológicos, usados simultaneamente para detecção de *Salmonella* spp em 244 amostras de alimentos sem contaminação experimental, empregando o método de cultura ISO 6579:2002 como método de referência. Os métodos avaliados foram BAX Salmonella, VIDAS Salmonella (SLM), Transia Plate Salmonella Gold, VIP Salmonella, TECRA UNQUIQUE SALMONELLA, Singlepath Salmonella e 1-2 Test. O nível de detecção para cada método também foi determinado, trabalhando-se com três matrizes alimentares diferentes, experimentalmente contaminadas com cinco níveis de inóculo. O método de referência detectou 50 amostras (20,5%) positivas para *Salmonella* spp. Nas condições em que o trabalho foi realizado, a porcentagem de concordância dos resultados positivos obtidos pelos métodos alternativos avaliados em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 variou de 42,3% a 100% nas amostras sem contaminação experimental e de 75% a 100% nas amostras artificialmente contaminadas, dependendo do método avaliado e da matriz alimentar analisada. Todos os métodos rápidos avaliados apresentaram resultados falso-positivos e falso-negativos, em frequências dependentes também do método avaliado e da matriz alimentar analisada. Os resultados obtidos evidenciaram que os métodos rápidos avaliados devem ser utilizados unicamente para fins de triagem, podendo haver um risco intrínseco na escolha de um método rápido para detectar *Salmonella* spp em determinada matriz alimentar. A seleção de um método rápido, em particular, só deve ser feita após a determinação do grau de risco que se queira assumir.

Palavras-chave: *Salmonella* spp, análise microbiológica de alimentos, métodos rápidos

ABSTRACT

Parallels between phenotypic, genotypic and immunological methods for rapid detection of *Salmonella* spp in non-contaminated food matrices: evaluation in real conditions of use

Salmonella spp is an important foodborne pathogen. The detection in foods by the cultural methodology takes at least five days to be completed and several automated systems and kits are available in the market for rapid detection of this pathogen. Most rapid methods are validated by internationally recognized organizations, but most validations have been conducted in artificial laboratory conditions, working with inoculated food samples, hardly reflecting the real conditions of a routine testing laboratory. In this study, seven immunological and genotypic rapid methods were used simultaneously for the detection of *Salmonella* spp in 244 non-inoculated food samples, and compared to the ISO 6754:2002 cultural method, used as reference. The rapid methods evaluated were BAX *Salmonella*, VIDAS *Salmonella* (SLM), Transia Plate *Salmonella* Gold, TECRA UNIQUE SALMONELLA, VIP *Salmonella*, Singlepath *Salmonella* and 1-2 Test. The lowest detection level for each method was also determined using three different food matrices experimentally contaminated with five levels of inoculum. Based on results obtained by the ISO 6754:2002 method, 50 (20.5%) samples were positive for *Salmonella* spp. In the conditions of the study, the agreement percentage of positive results obtained by each rapid method when compared to the positive results of the reference method varied between 42.3% and 100% in the non-inoculated food samples and between 75% and 100% in the experimentally contaminated samples, depending on the method and the tested food matrix. All rapid methods presented false-positive and false-negative results, and their frequency varied according to the method and the tested food matrix. Results confirmed that these rapid methods should be used for screening exclusively, and the selection of a rapid method for detection of *Salmonella* spp in foods may have an intrinsic risk. The degree of this risk needs to be determined before a particular method is selected.

Key-words: *Salmonella* spp, microbiological analysis of foods, rapid methods.

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de alimentos seguros é o desafio da indústria de alimentos, seja devido à pressão de órgãos de defesa de consumidores, fiscalizações por órgãos governamentais ou especificações cada vez mais rígidas do mercado internacional (barreiras não tarifárias).

A Qualidade pode ser obtida através do uso de diferentes ferramentas e o controle laboratorial valida os procedimentos adotados. Análises microbiológicas constituem-se em elemento-chave neste processo e o laboratório de microbiologia é o espaço onde a garantia da qualidade analítica será perseguida.

Os métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos surgiram como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial. Além desses objetivos, esses métodos visam também à simplificação do trabalho. Surgem constantemente novos sistemas com diferentes graus de automação, prontos para uso em laboratórios de análise de alimentos, destinados à detecção dos mais variados tipos de microrganismos e/ou suas toxinas (FENG, 2007).

A principal vantagem dos métodos rápidos é que têm sido utilizados como ferramentas de triagem (screening) em indústrias de alimentos, a fim de permitir liberação mais rápida de resultados. A necessidade da etapa de enriquecimento diminui o impacto causado pelos métodos rápidos, mas este fator limitante gradualmente se torna menos influente com a introdução de métodos mais sensíveis. Sendo uma ferramenta de triagem, os resultados negativos são considerados definitivos enquanto resultados positivos são considerados presuntivos, requerendo a confirmação dos resultados por um método de referência (FENG, 2007).

É importante reconhecer, no entanto, que as etapas de enriquecimento proporcionam muitas vantagens para o processo de detecção dos patógenos, como a redução do efeito inibitório potencialmente causado pela matriz alimentar, permitindo a multiplicação das células alvo (FENG, 2007).

A análise microbiológica em alimentos demanda várias etapas, cada uma com diferentes incubações. Na determinação de patógenos, a etapa de enriquecimento é quase sempre necessária e garante eficiência ao método analítico (FRANCO et al., 1992; FENG, 2007). A Figura 1 apresenta um exemplo mostrando que para detecção de *Salmonella* spp em alimentos são necessárias pelo menos 5 etapas distintas e com 4 incubações diferentes.

Figura 1- Fluxograma do método para detecção de *Salmonella* spp em alimentos segundo a ISO 6579:2002.

A escolha das metodologias analíticas a serem utilizadas depende de diferentes fatores, entre eles: facilidade e rapidez na execução do procedimento analítico, tempo necessário para obtenção dos resultados, custos, precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade, validações da metodologia, etc. (FENG, 2007).

Alguns métodos rápidos apresentam desempenho melhor em alguns alimentos do que em outros, indicando que a sua eficiência pode ser dependente do alimento analisado. Isto pode ser atribuído não apenas à complexidade das matrizes alimentares, mas também às diferentes tecnologias das metodologias utilizadas. Por exemplo, um componente do alimento pode interferir na construção do complexo antígeno-anticorpo, mas não afetar os ensaios baseados em DNA. Inversamente, outro componente pode inibir a hibridização do DNA, mas não afetar a construção do complexo antígeno-anticorpo. Além disso, os limites de detecção dos métodos variam amplamente e assim alguns métodos podem detectar níveis mais baixos de contaminação que outros. Devido aos inúmeros fatores que podem afetar a eficiência do ensaio, é recomendado um estudo comparativo para assegurar que determinado ensaio é efetivo para a aplicação pretendida (FENG, 2007).

O procedimento analítico ainda pode apresentar problemas decorrentes da distribuição heterogênea de patógenos nos alimentos, principalmente quando presentes em baixos níveis. Os patógenos podem ter sofrido estresse (injúria) durante o processamento dos alimentos. Tais aspectos podem causar problemas quanto à amostragem, especialmente na obtenção de amostras com resultados estatisticamente reprodutíveis. Um dos desafios tecnológicos para qualquer metodologia de análise microbiológica é a presença de bactérias da microbiota normal, presentes em altos níveis em alimentos crus, que podem interferir na análise, quando se objetiva uma sensibilidade de detecção de 1 célula/ 25g da amostra (FENG, 2007).

Segundo FENG, 2007, os métodos rápidos podem ser classificados em 4 grupos, especificamente:

a) Métodos bioquímicos miniaturizados

Os métodos de referência são dependentes da obtenção de uma cultura pura do microrganismo alvo, normalmente identificado através de suas características bioquímicas. Esta atividade requer trabalho intenso e é um processo demorado. Os kits miniaturizados fornecem um rápido perfil bioquímico de bactérias com grande economia de custo, trabalho e tempo. A maioria dos kits miniaturizados é passível de automação o que os torna convenientes quando se realizam grandes quantidades de testes. São exemplos de métodos pertencentes a esse grupo, o kit Salmonella Rapid Test OSRT (Oxoid Brasil Ltda), o API (bioMerieux Brasil SA), Mini-API (bioMerieux Brasil SA) e o Vitek (bioMerieux Brasil SA) e o Krystal (BBL - Becton, Dickinson and Company – EUA).

b) Meios de cultura modificados e substratos especiais

Incluem-se neste grupo, os métodos de filtração com membranas filtrantes hidrofóbicas, que ampliam a capacidade de contagem de microrganismos (Membranas Iso-grid, Neogen, EUA), os meios de cultura pré-dispensados em sistemas prontos para uso tais como as placas Petrifilm (3M do Brasil Ltda), Simplate (BioControl Systems Inc. - Brasil) e CompactDry (Madasa do Brasil), e meios de cultura com substratos cromogênicos especiais como ONPG e X-Gal para contagem de coliformes, X-Gluc e MUG para contagem de *Escherichia coli*, e diversos outros para testes bioquímicos de identificação de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *E.coli* 0157 e *Vibrio* spp. Fazem parte desse grupo ainda os testes de bioluminescência para quantificação de ATP, muito utilizados para monitoramento dos procedimentos de higienização de superfícies.

c) Métodos baseados em DNA

A este grupo pertencem os testes que empregam sondas genéticas e os baseados na reação de polimerase em cadeia (PCR). Os testes baseados em PCR são os métodos genéticos mais utilizados atualmente, havendo no mercado diversos sistemas comerciais, produzidos por diferentes fabricantes, citando-se como exemplo o sistema BAX (Qualicon-DuPont, EUA). Esses sistemas permitem a detecção rápida da maioria dos patógenos de relevância em alimentos, inclusive os recentemente descritos, como *Enterobacter sakazakii*.

Segundo FENG, 2007, esta técnica pode ser afetada negativamente pela complexidade das matrizes alimentares e pela presença de inibidores de PCR eventualmente presentes nos alimentos, interferência que ocorre mais freqüentemente em alimentos contendo altos níveis de proteína e gordura.

d) Métodos baseados em interações antígeno-anticorpo

A simplicidade e sensibilidade das interações antígeno-anticorpo têm facilitado o desenvolvimento de muitos sistemas analíticos nos mais variados formatos e constitui o maior grupo de métodos rápidos utilizados nos testes de alimentos.

Um dos formatos é a imunodifusão, que constitui o princípio do Kit 1-2 Test *Salmonella* (Oxoid Brasil Ltda), para detecção de salmonelas móveis em alimentos.

Os testes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) foram os primeiros sistemas comerciais para detecção rápida de patógenos. A maioria dos sistemas baseados em ELISA são ensaios tipo “sanduíche”, nos quais os patógenos investigados, se presentes no produto em teste, são capturados por anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida. Na etapa seguinte, o

complexo antígeno-anticorpo formado reage com um anticorpo específico ligado a uma enzima cromogênica ou fluorogênica (conjugado). Em seguida, o sanduíche formado reage com o substrato da enzima, resultando em desenvolvimento de cor ou de fluorescência. Como exemplo de kits ELISA, cita-se o TECRA UNIQUE SALMONELLA (3M do Brasil, Ltda), no qual a matriz sólida é constituída de um bastão impregnado com anticorpos para captura seletiva da bactéria alvo. Os testes ELISA, quando feitos manualmente, são bastante trabalhosos e sujeitos a erros operacionais, por isso muitos deles têm sido acoplados a auto-analisadores, que executam o teste automaticamente, em menos de uma hora. Cita-se como exemplo o Transia Plate *Salmonella* Gold (Diffchamb AB, Suécia) e o VIDAS (bioMérieux, França).

Um terceiro formato de método baseado em interações antígeno-anticorpo é o de imunoprecipitação, também conhecido como método imunocromatográfico ou de fluxo lateral. Este teste é constituído de um dispositivo plástico contendo duas ou três câmaras que se intercomunicam, contendo em seu interior material absorvente revestido com anticorpos específicos ligados a partículas de látex na câmara de inoculação, de anticorpos específicos na câmara do teste e de anticorpos específicos aos anticorpos ligados às partículas de látex na câmara controle. Uma alíquota da amostra enriquecida é adicionada na câmara de inoculação e se o patógeno alvo estiver presente, ocorre uma ligação anticorpo-látex e o complexo migra através do material absorvente. Na câmara teste, o complexo antígeno-látex anticorpo é capturado por anticorpos específicos a esse complexo, formando uma banda visível de precipitação. O excesso do complexo formado continua migrando até a câmara do controle, onde deve formar uma outra linha de precipitação que assegura que o material em análise migrou por todas as câmaras do kit. Estes

ensaios são simples e não requerem etapas de lavagem ou manipulação. Após as etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento os resultados estarão prontos em cerca de 10 minutos após a inoculação no kit. Como exemplo, citam-se os kits VIP *Salmonella* (BioControl, EUA) e o Singlepath *Salmonella* (Merck, Alemanha) (FUNG, 1994; PATEL, 1994; GIESE, 1995; GRIFFITHS, 1995; OLSON, 1996; FRANCO, 2000; FENG, 2007).

Validação dos métodos rápidos

Os métodos analíticos empregados no laboratório devem ser capazes de detectar o maior número possível de amostras contaminadas, ou seja, devem apresentar um grau de sensibilidade elevado. Todavia, nem sempre é possível detectar uma contaminação, principalmente quando esta estiver muito próxima do limite de detecção do método utilizado. Neste caso, pode ocorrer que o alimento esteja contaminado, mas o resultado do teste ser negativo, indicando, na verdade, um resultado falso-negativo.

Outra característica que estes métodos devem apresentar é a especificidade elevada, ou seja, devem ser capazes de identificar o contaminante pesquisado e somente ele. Contudo, se o método apresentar especificidade muito baixa, poderá conduzir a falso-positivos, já que o método não é capaz de distinguir microrganismos ou grupos de microrganismos com características semelhantes (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2000).

O lançamento de novos métodos rápidos para a análise de alimentos nem sempre vem acompanhado de informações suficientes sobre seu desempenho. Considerando que a eficiência de um método pode depender do alimento analisado, é fundamental que os novos métodos sejam avaliados comparativamente com

métodos já existentes, através de estudos de validações que garantam seu desempenho.

Com o aprimoramento tecnológico dos novos métodos rápidos, verifica-se que sua sensibilidade e capacidade de detectar níveis baixos de contaminação estão aumentando (FENG, 2007). Enquanto desejável do ponto de vista de segurança para o consumidor, esta característica representa um problema para a indústria de alimentos e órgãos fiscalizadores, porque o resultado da análise de controle poderá ser negativo quando usada uma metodologia analítica e positivo quando usada outra.

A maioria das validações de métodos de pesquisa de patógenos em alimentos é realizada por organizações independentes, internacionalmente reconhecidas, como a AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Nos Estados Unidos, agências reguladoras de alimentos, tais como o FDA (Food and Drug Administration) e USDA (U.S. Department of Agriculture), têm muito interesse na validação dos testes utilizados em alimentos, pois tais métodos são instrumentos fundamentais na avaliação da segurança alimentar. Métodos validados são posteriormente publicados pelo FDA, no Bacteriological Analytical Manual (BAM) ou pelo USDA-Food Safety and Inspection Service, no Microbiology Laboratory Guidebook (MLG).

A AOAC Internacional tem três programas de validação de novos métodos analíticos: os programas “Collaborative Study” e “Peer-Verified”, administrados pela AOAC, e o programa “Test Kit Performance Tested”, administrado pelo AOAC Research Institute (RI), uma outra divisão da AOAC (FENG, 2007).

O programa “Collaborative Study” é o mais importante e rigoroso de todos os programas de validação da AOAC. Este programa depende do trabalho voluntário de

inúmeros cientistas, envolvendo muitos laboratórios e muitas matrizes alimentares. Ao final deste processo colaborativo os resultados são avaliados por especialistas da AOAC e se o método atender as exigências, recebe o “status” de Método Oficial (FENG, 2007).

O programa “Peer-Verified” é uma simplificação do programa “Collaborative Study”, sendo que os métodos são validados baseando-se apenas na informação científica fornecida pelos fabricantes, que é checada em apenas um laboratório independente, selecionado pelos fabricantes (FENG, 2007).

Como o programa “Collaborative Study” é muito dispendioso e demorado, no início dos anos 90 a AOAC criou o programa “Test Kit Performance Tested” com o objetivo de validar novos métodos de uma forma mais rápida e simples, baseando-se apenas nas alegações dos fabricantes, que são avaliadas por um laboratório independente e revisadas por dois especialistas. Se as alegações comerciais forem confirmadas através dos resultados analíticos obtidos, o kit recebe a designação de “Performance Tested”. É importante observar que um kit com o status “Performance Tested” não é um Método Oficial AOAC.

De acordo com FENG, 2007, aspectos relacionados ao bioterrorismo e segurança alimentar, geraram uma situação emergencial onde em determinadas situações, uma extensa validação de métodos poderia não ser viável e procedimentos de validação mais rápidos seriam necessários para avaliação de métodos antes de sua utilização. Para situações deste tipo a AOAC, com o suporte da USDA-FSIS, desenvolveu o sistema e-CAM, que consiste na compilação eletrônica de métodos analíticos considerando o nível com que o método tenha sido avaliado. É um sistema disponível na internet, com a intenção de harmonizar métodos mundiais e permitir que a comunidade internacional acesse por via

eletrônica, a todos os tipos de métodos que possam ser adequados para suas necessidades.

Importância de *Salmonella* spp em alimentos

Salmonella spp é, certamente, o microrganismo patogênico de maior relevância em alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a salmonelose figura como uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos, seja pelo número de pessoas afetadas, complicações e seqüelas da doença, quantidade e volume de produtos alimentícios contaminados, seja pela perda econômica com tratamento médico e hospitalar ou reprocessamento e destruição de alimentos (KAKU et al., 1995).

Salmonella spp está amplamente difundida na natureza e pode ser encontrada no trato intestinal do homem e de animais, que excretam o microorganismo em suas fezes, podendo assim contaminar os alimentos (ELEY, 1994). Aves em geral, répteis, mamíferos domésticos e silvestres são espécies hospedeiras, ou seja, não apresentam sintomas de salmonelose (PELCZAR et al., 1996).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, não formadores de endósporos e quando móveis, apresentam flagelos peritríquios. As colônias são oxidase-negativas e fermentadoras de glicose, com formação de ácido e gás (Le MINOR, 1984; FRANCO e LANDGRAF, 1996; TRABULSI et al., 1999; GERMANO e GERMANO, 2003).

De acordo com EUZÉBY, 2008, o gênero *Salmonella* spp compreende 3 espécies, a saber:

Salmonella enterica, dividida em 6 sub-espécies:

- *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*

- *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
- *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
- *Salmonella enterica* subsp. *indica*
- *Salmonella enterica* subsp. *salamae*
- ***Salmonella bongori***
- ***Salmonella subterranea***

As salmonelas multiplicam-se em temperaturas entre 7°C e 49,5°C, sendo 35°C a 37°C a temperatura ótima para seu desenvolvimento (NEW ZEALAND, 2007).

A atividade de água (A_a) afeta diretamente o desenvolvimento deste microorganismo. Embora o limite mínimo de A_a seja de 0,94 para seu desenvolvimento, as salmonelas podem sobreviver por até mais de um ano em alimentos tais como chocolate, pimenta do reino, manteiga de amendoim e gelatina em pó, que possuem baixa A_a (GERMANO e GERMANO, 2003).

O pH ótimo para o seu desenvolvimento é ao redor da neutralidade, sendo que valores acima de pH 9 e abaixo de pH 3,8 são geralmente bactericidas. A natureza do ácido orgânico apresenta também influência nos valores limites de pH para o desenvolvimento bacteriano (JAY, 2000).

Os seres humanos são infectados por salmonelas quase exclusivamente devido ao consumo de água e alimentos contaminados. Os apreciadores de alimentos insuficientemente cozidos ou crus, notadamente carnes e gemas de ovos, são pessoas expostas à infecção. Além destes, profissionais que trabalham em agricultura, manufatura de produtos de origem animal, silvicultura, clínicas e

laboratórios, profissionais de saúde quando em investigações de campo pertencem a grupos de risco (GERMANO e GERMANO, 2003).

No Brasil, os surtos de enfermidades pelo consumo de alimentos não são analisados sistematicamente. No entanto, o relato de surto por salmonelose ocorrido em Araraquara, S. Paulo, por *Salmonella* Bredeney, afetando 561 funcionários de uma empresa com 42 hospitalizações (7,5%), é significativo da extensão do problema (KAKU et al., 1995).

Na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de julho de 1993 a junho de 1997 foram registrados 23 surtos de salmoneloses por *Salmonella* Enteritidis, sendo que 2 dos surtos ocorreram em indústrias, 1 em escola, 8 em lanchonetes, 3 em restaurantes, 5 em festas, 2 em residências familiares, 1 em asilo e 1 em hospital (PERESI et al., 1998).

No Rio Grande do Sul, em 2000, ocorreram 99 surtos de doenças transmissíveis por alimento (DTA's), sendo que 74,7% dos surtos foram ocasionados por *Salmonella* spp. As matrizes alimentares envolvidas nos surtos foram alimentos preparados com ovos, com incidência de 72,2%, e carne de frango com incidência de 11,4%, revelando que 83,6% dos casos tiveram como matrizes, alimentos oriundos da cadeia avícola. Outras matrizes alimentares apareceram em menor frequência (cappelletti com incidência de 3,8%, lasanha 2,8%, carne bovina 2,5%, risoto 1,3% e bacon 1,2%) (NARDVORNY et al., 2004).

Nos Estados Unidos, o Center for Diseases Control and Prevention (CDC) estima que ocorram naquele país, anualmente mais de 40.000 casos de salmonelose, com cerca de 500 mortes (COHEN e TAUXE, 1986). Os maiores surtos de salmonelose ocorreram quando foram servidos alimentos a grande número de comensais, tais como banquetes, ceias e eventos semelhantes. Um grande surto

ocorreu em 1994 e envolveu mais de 224.000 pessoas, a matriz alimentar envolvida foi sorvete produzido com leite previamente transportado em caminhão-tanque, que havia transportado ovos líquidos. O sorotipo foi *S. Enteritidis* e casos foram observados em pelo menos 41 estados dos Estados Unidos (RYAN et al, 1987).

Outro surto foi em 1985 e envolveu cerca de 200.000 pessoas e a matriz alimentar envolvida foi o leite produzido por uma fábrica de laticínios e *S. Typhimurium* foi o agente etiológico. Mencione-se, ainda o surto ocorrido em 1974 na reserva indígena Navajo, quando 3.400 pessoas ficaram doentes e a matriz alimentar envolvida foi salada de batatas servidas em um churrasco. A salada havia sido preparada e armazenada por cerca de 16 horas, sob exposição abusiva de temperaturas. O sorotipo isolado foi *S. Newport* (HORWITZ et al, 1977).

Para o período de 1975 a 1987, foram relatados 4.944 casos de doenças alimentares em 26 estados americanos com 51 mortes. Destes casos, 52% dos surtos e 81% dos óbitos ocorridos foram devido a *Salmonella* spp. A *S. Enteritidis* foi o sorotipo líder destas ocorrências. Surtos de salmonelose causados principalmente por *S. Hartford* ocorreram no estado da Florida em 1995 e a matriz alimentar envolvida foi suco de laranja (fresco e espremido) não pasteurizado. Outro surto envolvendo suco de laranja não pasteurizado ocorreu em 15 estados americanos e duas províncias canadenses no verão de 1999 e o sorotipo encontrado foi *S. Muenchen* (PARISH, 1998).

Durante o período de 1985 a 1995 nos Estados Unidos, *S. Enteritidis* de casca de ovos crus foram responsáveis por 582 surtos, com 34.058 casos e 70 óbitos. Um estudo realizado no Canadá no período de 1983 a 1986 em carnes bovinas, suínas e produtos avícolas revelou a presença de *Salmonella* spp em 17.5% de 596 amostras suínas, 60.9% de 670 amostras de frango, mas somente

2.6% de amostras de carnes bovinas. Em outro estudo canadense, do conteúdo cecal de 1.420 suínos saudáveis, das amostras positivas encontradas para *Salmonella* spp, 42% foram *S. Brandenburg*. De 112 cepas de *Salmonella* recuperadas de matadouros de aves na Espanha em 1992, 77% foram de *S. Enteritidis*. Durante os anos 70, foi relatada incidência de 5% *S. Enteritidis* entre as salmonelas isoladas em todo o Estados Unidos e em 1989 esta incidência aumentou para cerca de 20%. Em 1987, de todas as salmonelas isoladas nos Estados Unidos, a *S. Typhimurium* apresentou 16% de incidência. *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram os sorotipos mais encontrados em ovos na Espanha e causa predominante de salmonelose na Inglaterra e Gales em 1988, onde foram encontrados tanto em ovos como em carne de aves (HINTON et al, 1990).

São apresentados na Tabela 1 os números de surtos, casos e óbitos por doenças causadas por alimentos contaminados com diferentes agentes bacterianos nos Estados Unidos, no período de 1998 a 2002, indicando que *Salmonella* spp. foi o principal responsável pelos surtos e casos. No entanto, o agente responsável pelo maior número de óbitos foi *Listeria monocytogenes*, embora o número de surtos devido a este patógeno tenha sido bem menor (LYNCH et al., 2006).

Os estudos de salmoneloses associados aos alimentos nos Estados Unidos mostram que no período de 1998 a 2002 houve maior ocorrência de surtos na época do verão norte-americano (Tabela 2) (LYNCH et al., 2006).

A Figura 2, divulgada pelo “United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service”, evidencia que diferentes alimentos podem estar envolvidos em surtos causados por *Salmonella* spp. Confirmaram-se 28.000 a 30.000 casos de salmoneloses, anualmente, no período 1998-2003 (UNITED STATES, 2007).

Tabela 1 – Número total de surtos, casos e óbitos por doenças causadas por alimentos contaminados com diferentes agentes bacterianos nos Estados Unidos, no período de 1998 a 2002, com etiologia conhecida

Agente	Surtos		Casos		Óbitos	
	Número	%	Número	%	Número	%
<i>B. cereus</i>	37	3,1	571	1,5	0	0,0
<i>Brucella</i>	1	0,1	4	0,1	0	0,0
<i>Campylobacter</i>	61	5,2	1.440	3,8	0	0,0
<i>C. botulinum</i>	12	1,0	52	0,1	1	1,4
<i>C. perfringens</i>	130	11,0	6.724	17,8	4	5,7
<i>E coli</i>	140	11,8	4.854	12,8	4	5,7
<i>L. monocytogenes</i>	11	1,0	256	0,7	38	54,3
<i>Salmonella</i>	585	49,4	16.821	44,5	20	28,6
<i>Shigella</i>	67	5,6	3.677	9,7	1	1,4
<i>S. aureus</i>	101	8,4	2.766	7,3	2	2,9
<i>Streptococcus</i>	1	0,1	4	0,1	0	0,0
<i>V. cholerae</i>	3	0,3	12	0,1	0	0,0
<i>V. parahemolyticus</i>	25	2,1	613	1,6	0	0,0
Vibrio, outro	1	0,1	2	0,1	0	0,0
<i>Y. enterocolitica</i>	8	0,7	87	0,2	0	0,0
Outras bactérias	1	0,1	4	0,1	0	0,0
Total de bactérias	1.184	100	37.887	100	70	100

Tabela 2 - Números de surtos de salmoneloses reportados por mês de ocorrência nos Estados Unidos no período de 1998 a 2002

Período de ocorrência											
Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
32	22	31	43	50	88	80	76	61	33	39	30

Figura 2 - Casos de salmoneloses em seres humanos, atribuídos à carne, frango e ovos, ocorridos nos Estados Unidos entre 1998 e 2003 (UNITED STATES, 2007).

Estão relacionados, a seguir, alguns dos surtos recentes de salmoneloses notificados pelo CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, nos Estados Unidos:

- **julho de 2006:** 41 indivíduos infectados com *Salmonella* Oranienburg presente em salada de frutas (CLARK, 2007)
- **setembro de 2006:** 183 indivíduos infectados com *Salmonella* Typhimurium presente em salada de tomates (UNITED STATES, 2006)
- **fevereiro de 2007:** 329 indivíduos infectados com *Salmonella* Tennessee presente em manteiga de amendoim (UNITED STATES, 2007a)
- **julho de 2007:** 65 indivíduos infectados com *Salmonella* Wandsworth em um alimento constituído de arroz, milho e vegetais (UNITED STATES, 2007b)
- **agosto de 2007:** 181 indivíduos infectados com *Salmonella* enterica 4,(5),12:i- presente em uma torta (UNITED STATES, 2007c)

Métodos rápidos para detecção de *Salmonella* spp em alimentos

Devido à importância de *Salmonella* spp para a área de alimentos, há no mercado muitos kits para análise rápida desse patógeno em alimentos.

A Tabela 3 apresenta uma lista dos kits de detecção de *Salmonella* spp para os quais a AOAC concedeu o status de “Performance Tested Methods”, que atesta as alegações feitas pelos fabricantes.

A listagem apresentada na Tabela 4 refere-se aos kits disponíveis no mercado para detecção de *Salmonella* spp e seus respectivos reconhecimentos.

Tabela 3 - Kits para detecção de *Salmonella* spp em alimentos com status de “Performance Tested Method” (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2008)

Nome do Kit	Fabricante	Número de catálogo	Número da licença	Data de expedição do certificado	Matrizes testadas
Reveal	Neogen Corporation	9718	960801	04/09/1996	alimentos
Bioli <i>Salmonella</i> ELISA Test kit	Bioline	96/1	960901 NMKL Revisado e Reconhecido	05/08/1996	Alimentos e ração animal
Oxoid <i>Salmonella</i> Rapid Test	Oxoid Ltd.	FT201; SRTEM; CM857	960902	12/12/1996	Alimentos, ração animal e amostras ambientais
Gene Trak <i>Salmonella</i> DLP Assay	Neogen Corporation	GT0614; GT0814	961101	16/12/1996	Alimentos, ração animal e amostras ambientais
GeneQuence <i>Salmonella</i> Microwell assay	Neogen Corporation	Desconhecido	030201	07/03/2002	Alimentos
PATHATRIX System <i>Listeria/Salmonella</i>	Matrix MicroScience Ltd.	PD50	090202	05/09/2002	Alimentos
					Continua

Continuação (Tabela 3)

Nome do Kit	Fabricante	Número de catálogo	Número da licença	Data de expedição do certificado	Matrizes testadas
PATHATRIX System <i>Salmonella</i>	Matrix MicroScience Ltd.	PS50	090203	09/09/2002	Alimentos
PATHATRIX <i>Salmonella</i> Species Pooling Test System	Matrix MicroScience Inc.	PS250-P	090203B	08/02/2005	Presunto cozido, ovos, chocolate em pó, camarões congelados
BAX® System PCR	Qualicon, Inc.	17710608	100201	18/11/2002	Alimentos
RapidChek <i>Salmonella</i> assay	Strategic Diagnostics	700166	030301	28/03/2003	Alimentos
Roche Diagnostics LightCycler® foodproof <i>Salmonella</i> Detection Kit for <i>Salmonella</i> spp In combination with ShortPrep foodproof	Manufactured by Roche Diagnostics GmbH Developed by Bioteccon Diagnostics GmbH	3 357 449 LightCycler® foodproof	120301	19/12/2003	Alimentos

Continua

Continuação (Tabela 3)

Nome do Kit	Fabricante	Número de catálogo	Número da licença	Data de expedição do certificado	Matrizes testadas
Singlepath® <i>Salmonella</i> Lateral Flow Assay	Merck KGaA EMD Chemicals, Inc.	1.04140.0001/ 1.04140.0002	060401	09/09/2004	Alimentos
Warnex™ Rapid Pathogen Detection System for <i>Salmonella</i>	Warnex, Diagnostics, Inc.	Desconhecido	070402	28/09/2004	Alimentos
BBL™ CHROMagar™ <i>Salmonella</i>	BD Diagnostics	214983, 254104, 251356, 251357	020502	19/02/2005	Alimentos
Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold	Diffchamb	SA0180 SA0190	010602	13/01/2006	Alimentos
Dupont Lateral Flow System <i>Salmonella</i> Test Kit	DuPont Qualicon	18220009	020601	09/02/2006	Alimentos
					Continua

Continuação (Tabela 3)

Nome do Kit	Fabricante	Número de catálogo	Número da licença	Data de expedição do certificado	Matrizes testadas
Assurance GDS For <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	61008-100	050602	12/05/2006	Carnes bovina e suína cruas, carne moída de peru, água de lavagem de frango, camarão cru, ovo, leite fluído, leite desnatado em pó, aço inoxidável, borracha e concreto
RapidCheck™ Select™ Salmonella Test	Strategic Diagnostic, Inc.	7000191	080601	04/09/2006	Alimentos
Rapid <i>Salmonella</i> Agar	Bio-Rad Laboratories	356-3961 (placas prontas) 356-4705 (550g de meio) 356-4706 (100g de meio)	050701	29/05/2007	Peito de frango cru, ovo, cantaloupe

Tabela 4 - Kits para detecção de *Salmonella* spp em alimentos, disponíveis no mercado e seus reconhecimentos (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2003)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
ANI Salmonella Látex Test	ANI Biotech OU	Desconhecido	Cultura pura
1-2 Test	BioControl Systems, Inc.	AOAC Official Method 989.13 MLP-70 AFNOR	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Assurance Gold <i>Salmonella</i> EIA	BioControl Systems, Inc.	AOAC Official Method 999.08	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Assurance <i>Salmonella</i> EIA	BioControl Systems, Inc.	AOAC Official Method 992.11	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
VIP <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	AOAC Official Method 999.09	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> ELISA / Mastazyme <i>Salmonella</i>	Bioline / Mast Diagnostics	Performance Tested Method 960901 AFNOR, NMKL NORDVAL	Alimentos, swabs e água

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
Bactometer	BioMerieux	Desconhecido	Alimentos, embalagem asséptica, amostras ambientais e farmacêuticas
VIDAS immuno Concentration <i>Salmonella</i>	BioMerieux	AOAC Official Method 2001.07, 2001.08, 2001.09; AFNOR	Alimentos
VIDAS <i>Salmonella</i> (SLM)	BioMerieux	AOAC Official Method 996.08; AFNOR	Alimentos e ingredientes
Foodproof <i>Salmonella</i>	BioteCon Diagnostics	DIN	Alimentos secos, confeitos e carnes
PATH-STIK	Celsis Ltd.	Performance Tested Method 941001	Alimentos
Transia Card <i>Salmonella</i>	Diffchamb AB	Desconhecido	Carne, ave, peixe, ovos e outros produtos; amostras ambientais

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold	Diffchamb AB	AFNOR; NORDVAL	Alimentos
RABIT	Don Whitley Scientific	Desconhecido	Alimentos e amostras biológicas
CHEKIT <i>Salmonella</i> Enteritidis Kit	Dr. Bommeli AG	Desconhecido	Alimentos e amostras ambientais
Dynabeads Anti- <i>Salmonella</i>	Dynal Biotech	Performance Tested Method 970401; AFNOR; DIN 16/1-0696	Alimentos e amostras ambientais
EIAFoss <i>Salmonella</i>	Foss Electric A/S	Performance Tested Method 980801; DanVal 23000-88	Alimentos
<i>Salmonella</i> Screen CLIA	GEM Biomedical	Desconhecido	Alimentos
FlockCheck <i>Salmonella</i> enteritidis Antibody Test Kit	IDEXX Laboratories	Desconhecido	Carne bovina e aves

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
PATH/GEN ^R <i>Salmonella</i> Test	IGEN	NPIP approved	Carne bovina, aves, outros produtos alimentares e amostras Ambientais
<i>Salmonella</i> enteritidis Pathogen Detection Kit	Intelligent Monitoring Systems	Desconhecido	Alimentos e água
Salmotype	Labor Diagnostik Leipzig	Desconhecido	Frango e porco
Diasalm	Merck KGaA	Desconhecido	Desconhecido
Singlepath <i>Salmonella</i>	Merck KGaA	Desconhecido	Alimentos
MicroScreen <i>Salmonella</i>	Microgen Bioproducts Ltd.	Desconhecido	Cultura pura.
Path-Chek	Microgen Bioproducts Ltd.	Desconhecido	Alimentos
Alert for <i>Salmonella</i>	Neogen corp.	Desconhecido	Alimentos
GENE TRAK <i>Salmonella</i> Assay	Neogen Corporation	AOAC Official Method 987.10	Alimentos

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
GENE TRAK Salmonella DLP Assay	Neogen Corporation	Performance Tested Method 961101; AOAC Official Method 990.13	Alimentos
ISO-Grid + EF 18 Agar	Neogen Corporation	Desconhecido	Desconhecido
REVEAL for <i>Salmonella</i>	Neogen Corporation	Performance Tested Method 960801	Desconhecido
<i>Salmonella</i> Capture-Tek	Organon Teknika	Desconhecido	Alimentos
<i>Salmonella</i> Tek	Organon Teknika	AOAC Official Method 986.35; 987.11; 993.08 USDA-FSIS 5/94	Alimentos
O.B.I.S. PYR Test	Oxoid Ltd.	Desconhecido	Alimentos
O.B.I.S <i>Salmonella</i> Test	Oxoid Ltd.	Desconhecido	Alimentos
Oxoid Rapid <i>Salmonella</i> Test Kit	Oxoid Ltd.	Performance Tested Method 960902	Alimentos e amostras ambientais

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
S.P.R.I.N.T. <i>Salmonella</i> Enrichment system	Oxoid Ltd.	Desconhecido	Alimentos
TaqMan for <i>Salmonella</i>	PE Biosystems	Desconhecido	Cultura pura
BAX for confirming Suspect Colonies / <i>Salmonella</i>	Qualicon	Desconhecido	Alimentos e aves
BAX for Screening/ <i>Salmonella</i>	Qualicon	Performance Tested Method 970801	Alimentos e aves
Locate	Rhone Poulenc Diagnostics	AFNOR	Alimentos
Spectate	Rhone Poulenc Diagnostics	Desconhecido	Alimentos
Pastorex	Sanofi Diagnostics Pasteur	Desconhecido	Desconhecido
PROBELIA	Sanofi Diagnostics Pasteur	AFNOR	Cultura pura
BACIdent <i>Salmonella</i> spp DNA Detection System	Scil Diagnostics	Desconhecido	Alimentos
ISO Screen <i>Salmonella</i>	Stratecon Diagnostics	Desconhecido	Alimentos e água

Continua

Continuação (Tabela 4)

Nome do Kit	Fabricante	Reconhecimento	Matrizes testadas
C QUIC PLUS <i>Salmonella</i>	Sun international	Desconhecido	Desconhecido
Bac Trac 4100	Sy Lab	Desconhecido	Alimentos, bebidas e swabs
TECRA UNIQUE SALMONELLA	TECRA Diagnostics	Performance Tested Method 971001; AOAC Official Method 2000.07; VDI; NMKL	Alimentos, amostras relacionadas a alimentos e ambientais amostras
TECRA <i>Salmonella</i> VIA	TECRA Diagnostics	AOAC Official Method 989.14; USDA; NZDB MIRINZ; DPIE/AQIS; AFNOR; DanVal	Alimentos, amostras relacionadas a alimentos e amostras ambientais
DIA/PRO FAST-Q™ <i>Salmonella</i> spp.	Umedik Inc.	Desconhecido	Alimentos
<i>Salmonella</i> Screen/ <i>Salmonella</i> verify	VICAM	Performance Tested Method 961002	Alimentos e amostras ambientais
GENEVISION <i>Salmonella</i> spp.	Warnex Diagnostics Inc.	Compendium of Analytical Methods MFLP-32	Alimentos

AFNOR- Association Française de Normalisation

AOAC- Association of Analytical Communities

DIN- Deutsches Institut für Normung (Instituto Alemão para Normatização)

DPIE/AQIS- Department of Primary Industries and Energy - Australian Quarantine

MIRINZ- Meat Industry Research Institute of New Zealand

NMKL- Método do Comitê Nórdico de Análise de Alimentos

NordVal- Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods

NPIP- National Poultry Improvement Plan

NZDB- New Zealand Dairy Board

USDA-FSIS- United States Department of Agriculture- Food Safety and Inspection Service

VDI- Verein Deutscher Ingenieure

Dos inúmeros métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* spp em alimentos disponíveis do mercado, vários já foram submetidos a estudos de avaliação de desempenho.

Embora contenham informações valiosas a respeito da conveniência de uso desses métodos, estes estudos apresentam limitações, não reproduzindo adequadamente as condições de trabalho de um laboratório de rotina de análise de alimentos. As principais limitações são as matrizes alimentares avaliadas nestes estudos, que dificilmente contemplam a ampla variedade de alimentos que são analisados em um laboratório de rotina e a realização da análise de matrizes alimentares em condições laboratoriais artificiais.

Muitos dos kits comercializados no Brasil possuem validações em diferentes instituições internacionais. No entanto, pouco se conhece em nosso país quanto a real aplicabilidade destes métodos em condições reais de uso em laboratórios de rotina, com diferentes matrizes alimentares, níveis de contaminação desconhecidos, diferentes microrganismos interferentes e diversidade de necessidades de resposta.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar kits de detecção rápida de *Salmonella* spp em alimentos* dentre aqueles comercializados no Brasil, nas seguintes condições de uso:
 - ✓ Matrizes naturais, sem contaminação experimental;
 - ✓ Emprego simultâneo dos sistemas em avaliação, para análise de uma mesma amostra de alimento, empregando o método ISO 6579:2002, como método de referência;
2. Contribuir com informações que possam subsidiar os laboratórios na seleção de novos métodos analíticos para detecção de *Salmonella* spp em alimentos.

* Kits avaliados:

- BAX Salmonella (Qualicon – DuPont)
- TECRA UNIQUE SALMONELLA
- VIP Salmonella (Biocontrol)
- Transia Plate Salmonella Gold (Diffchamb)
- VIDAS Salmonella (SLM) (Biomérieux)
- Singlepath Salmonella (Merck)
- 1-2 Test (Biocontrol)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de alimentos analisadas

O estudo foi realizado com 244 amostras de alimentos, selecionadas entre aquelas recebidas pela SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda para análises de rotina, no período de outubro de 2007 a janeiro de 2008. As amostras foram selecionadas em função do histórico de resultados positivos para *Salmonella* spp nestas matrizes, no laboratório SFDK. Os alimentos foram distribuídos em quatro grupos, conforme descrito na Tabela 5. Os produtos perecíveis foram armazenados congelados (-10 a -25°C) até o início das análises. Para realização das análises as amostras foram descongeladas sob refrigeração. Os produtos não perecíveis foram mantidos em temperatura ambiente.

Tabela 5 - Distribuição dos grupos de amostras analisadas

Grupos	Número de Amostras	
Frango, ovos e produtos avícolas	143	58,6 %
Farelo de soja	44	18,0 %
Carnes e produtos cárneos	37	15,2 %
Outros produtos	20	8,2 %
Total	244	100,0 %

O método utilizado como referência foi aquele descrito na norma ISO 6579:2002, descrito em 3.2.2. Os métodos rápidos escolhidos para o

desenvolvimento deste trabalho foram selecionados entre aqueles com maior representatividade comercial no Brasil, descritos em 3.2.3 a 3.2.9.

Na Tabela 6 estão apresentados os métodos avaliados e o número de amostras analisadas com cada um deles.

Tabela 6- Métodos e número de amostras de alimentos utilizados no estudo

Métodos	Número de Amostras
ISO 6579:2002	244
BAX Salmonella	244
TECRA UNIQUE SALMONELLA	145
VIP Salmonella	85
Transia Plate Salmonella Gold	85
VIDAS Salmonella (SLM)	88
Singlepath Salmonella	87
1-2 Test	87
Total de análises realizadas	1.065

Para a realização dos testes, foram seguidas as instruções dos respectivos fabricantes, partindo-se sempre da mesma cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1.

Considerando-se que o trabalho foi realizado em meio à rotina laboratorial, em casos de dificuldade na leitura dos resultados, outros técnicos treinados colaboraram na leitura dos resultados do kit, considerando como resultado final aquele que prevalecesse.

3.2. Metodologias Analíticas

3.2.1. Preparo das amostras (pré-enriquecimento)

Vinte e cinco gramas de cada amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada (Oxoid, CM509), empregando-se um stomacher. A mistura foi incubada a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 16 - 20h. No caso de leite em pó, 25g de amostra foram homogeneizados com 225 mL de água destilada estéril, adicionando-se em seguida 0,45 mL de solução de verde-brilhante a 1% e a seguir a mistura foi incubada a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 16 - 20h (ANDREWS & HAMMACK, 1998).

3.2.2. Método ISO 6579:2002

Enriquecimento seletivo: a partir da cultura de pré-enriquecimento preparada conforme descrito em 3.2.1. uma porção de 0,1 mL foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) e incubada a $(42 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 21 - 27h. Outra porção de 1 mL foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Tetratonato Muller-Kauffmann com novobiocina (MKTTn) (Merck, 105878) e incubada a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 20 - 24h.

Isolamento: após incubação, um inóculo de cada caldo foi transferido para placas com ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Oxoid, CM469) e ágar Verde Brilhante (BGA) (Oxoid, CM0263), com incubação à $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 21-27h.

Confirmação Bioquímica e Sorológica: após a incubação, 2 a 4 colônias típicas de *Salmonella* spp foram submetidas à provas bioquímicas, empregando-se ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Oxoid, CM277), caldo lisina (Difco, 0215-17), caldo uréia (Oxoid, CM71) e kit API 20E (bioMérieux Brasil). Colônias indicativas de *Salmonella* spp foram confirmadas através de testes de aglutinação em lâmina,

empregando-se soro polivalente “O” (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda).

3.2.3 BAX Salmonella (Qualicon – DuPont) (Figuras 3, 4 e 5)

O sistema BAX utiliza a tecnologia de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) automatizada, em tempo real, que cria milhões de cópias do fragmento do DNA alvo, se presente. Os componentes do kit incluem os tubos com as pastilhas contendo os reagentes do PCR, o tampão de lise e a protease.

Figura 3 - Foto ilustrativa do equipamento BAX System

Enriquecimento: 10 μ L da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foram transferidos para um tubo contendo 500 μ L de caldo BHI, incubando-se a $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 3 h. Para produtos cárneos esta etapa não foi realizada.

Realização do teste: Os blocos para reação de lise das células e para desnaturação das proteínas foram aquecidos a 37°C e a 95°C , respectivamente, e o software do Termociclador/Detector foi inicializado.

Foram transferidos 5 μ L da amostra enriquecida em caldo BHI para um tubo contendo 200 μ L da solução tampão de lise, adicionado de protease (150 μ L de

proteínase K em 12 mL de tampão de lise). Após os blocos terem atingido as temperaturas de trabalho, os tubos foram colocados no bloco à 37°C por 20 minutos. A seguir os tubos foram transferidos para o bloco a 95°C por 10 minutos. Após a reação de lise, os tubos foram transferidos para o bloco de resfriamento a 4 - 8°C por 5 minutos.

Em seguida 50 µL da amostra foram transferidos para os tubos com as pastilhas de PCR e colocados no Termociclador/Detector. Resultados presuntivos positivos e negativos foram obtidos através de leitura direta do relatório emitido pelo software. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

BAX® System e a tecnologia PCR

Figura 4 - Esquema do ensaio pelo método BAX System

Figura 5 - Foto ilustrativa dos blocos aquecedores

3.2.4. TECRA UNIQUE SALMONELLA (Figura 6)

TECRA UNIQUE SALMONELLA combina, em um único módulo, imunoenriquecimento com imunoensaio, utilizando como base fixa um bastão recoberto com anticorpos policlonais específicos para *Salmonella* spp móveis e imóveis. Todos os reagentes do teste vêm previamente distribuídos nos recipientes que formam o kit.

Figura 6 - Foto ilustrativa do kit TECRA UNIQUE SALMONELLA

Realização do teste: 1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foi transferido para o tubo 1 do kit. Após introdução do bastão no tubo 1, o mesmo foi movimentado para cima e para baixo duas vezes. O kit com o bastão posicionado no recipiente 1 foi incubado por 20 - 40 minutos a $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o bastão foi transferido para o recipiente 2 (passo de lavagem), movimentado para cima e para baixo quatro vezes e transferido para o recipiente 3. O kit com o bastão posicionado no recipiente 3 foi incubado por 4 - 5 horas a $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Após essa incubação, o bastão foi transferido para o recipiente 4. Após cobrir os recipientes 1, 2 e 3 com fita própria, cedida pelo fornecedor, o kit com o bastão posicionado no recipiente 4 foi incubado por 30 - 40 minutos a $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. O bastão foi transferido para o recipiente 5 (passo de lavagem), movimentado para cima e para baixo cinco vezes e transferido para o recipiente 6. O kit com o bastão posicionado no recipiente 6 foi incubado por 10 minutos a $20 - 25^{\circ}\text{C}$. O resultado do teste foi considerado presuntivo positivo quando o bastão apresentava coloração acinzentada / púrpura nas zonas de leitura de resposta do teste e do controle positivo. O resultado foi considerado negativo quando houve desenvolvimento de coloração somente na zona de leitura do controle positivo. Quando não houve desenvolvimento de coloração na zona de leitura do controle positivo, o teste foi classificado como inválido. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

3.2.5. VIP Salmonella (Biocontrol) (Figura 7)

VIP Salmonella é um teste imunoenzimático visual de única etapa para detecção de espécies móveis e imóveis de *Salmonella* spp. Possui um sistema de

reagentes que formam um complexo cromogênico antígeno-anticorpo, quando houver presença de *Salmonella* spp.

Figura 7 - Esquema analítico do método VIP Salmonella.

Enriquecimento seletivo: Para produtos frescos, 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco, 218581) e 1 mL para outro tubo contendo 10 mL de caldo tetratonato (Difco, 210430), incubando-se a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 16 - 24h.

Pós-enriquecimento: Em seguida, 0,5 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis e 0,5 mL do caldo Tetratonato foram transferidos para um único tubo com 10 mL de caldo TSB (Merck, 105459) com novobiocina e incubado a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 6 - 8h.

Realização do teste: Após a incubação do caldo TSB, 1 mL foi transferido para um tubo vazio estéril e adicionou-se 0,1 mL de cada um dos 2 reagentes de extração que acompanham o kit. Após aquecimento em água fervente por 10 minutos, 0,1 mL da mistura TSB + reagentes de extração foi transferida para o recipiente circular do kit. A leitura foi realizada após 10 minutos em temperatura

ambiente. A resposta foi considerada presuntiva positiva quando houve o aparecimento de uma faixa escura no primeiro campo de leitura à direita da área inoculada e também no campo de leitura controle. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

3.2.6. Transia Plate Salmonella Gold (Diffchamb) (Figura 8)

Transia Plate Salmonella Gold é um teste ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para determinação de bactérias do gênero *Salmonella* spp. O suporte sólido da reação é uma placa com micro-poços, em tiras plásticas divisíveis, sensibilizada com anticorpos específicos para *Salmonella* spp.

Figura 8 - Fotos ilustrativas da placa com micro-poços (esquerda) e do equipamento Transia Elisamatic II (direita)

Realização do teste:

Enriquecimento seletivo: 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) e incubado a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24h.

Após a incubação, 1 a 2mL do caldo RVS foi aquecido por 20 min em água fervente para sua inativação e esfriado até a temperatura ambiente.

Ensaio automatizado com o Transia Elisamatic II

Após a inicialização do equipamento, transferiu-se para os micro-poços 100 µL do caldo RVS inativado, bem como 100 µL dos controles positivo e negativo que acompanham o kit. Os micro-poços e os reagentes necessários foram posicionados no aparelho nos locais indicados pelo fabricante. O software foi acionado, registrando-se as amostras na programação do aparelho. Na seqüência o aparelho iniciou o protocolo analítico, com leitura automática dos resultados positivos e negativos. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

Ensaio não automatizado

Os micro-poços necessários para realização dos testes, incluindo dois para o controle negativo e um para o controle positivo, foram posicionados em um suporte. A seguir, transferiu-se para os micro-poços 100 µL do caldo RVS inativado, bem como 100 µL dos controles positivo e negativo que acompanham o kit. Após 1 hora a temperatura ambiente, esvaziou-se o conteúdo dos micro-poços, enxaguando cinco vezes com o tampão de lavagem que acompanha o kit. Em seguida, adicionou-se a cada micro-poço 100 µL do conjugado (anticorpos anti-salmonela conjugados com peroxidase) fornecido juntamente com o kit. Após 30 min em temperatura ambiente, removeu-se o conteúdo dos micro-poços, efetuando-se novamente a lavagem com o tampão. Em seguida, adicionou-se 100 µL da mistura substrato / cromógeno recém-preparada conforme instrução do fabricante (mistura de 60 µL do substrato e 60 µL do cromógeno, que acompanham o kit). Em conseqüência da adição dessa mistura, os micro-poços apresentaram a coloração

azul. Após 15 min em temperatura ambiente, adicionou-se 100 µL da solução do inibidor da atividade enzimática, que acompanha o kit, seguindo a mesma ordem usada na adição do substrato. Para conversão completa da cor, o conteúdo de cada micro-poço foi homogeneizado agitando-se o suporte com movimentos circulares sobre a bancada. A amostra analisada foi considerada positiva para *Salmonella* spp quando a coloração azul se transformou em amarelo. A amostra foi considerada negativa para *Salmonella* spp quando a coloração azul se transformou em incolor. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

3.2.7. VIDAS Salmonella (SLM) (Biomérieux) (Figura 9)

VIDAS Salmonella é um teste imunoenzimático que permite a detecção de antígenos de *Salmonella* spp pela técnica ELFA (enzyme linked fluorescent assay). Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente no aparelho MiniVidas desenvolvido pelo fabricante deste kit. O sistema emprega uma ponteira plástica descartável revestida internamente por anticorpos monoclonais anti-salmonela. Os outros reagentes da reação imunológica estão distribuídos nos diferentes compartimentos de uma barrete, conforme mostra a Figura 9.

Enriquecimento seletivo: 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Xpress (Biomérieux), incubando-se a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas.

Realização do teste: 1 a 2 mL do caldo Xpress foi aquecido em água fervente por 15 ± 1 min e em seguida resfriado até a temperatura ambiente. O caldo inativado foi então transferido para o primeiro compartimento da barrete, que foi introduzida no aparelho MiniVidas. O aparelho foi acionado, com a leitura automática

do resultado após 60 min. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

Figura 9- Foto ilustrativa do aparelho MiniVIDAS (ao fundo) e das barretes

3.2.8. Singlepath Salmonella (Merck) (Figura 10)

Singlepath Salmonella é um teste rápido imunocromatográfico baseado em anticorpos específicos para *Salmonella* spp. O dispositivo do teste conta com um poço circular onde a amostra é inoculada e um poço oval onde se encontram as janelas de resposta do controle (C) e a janela de resposta do teste (T).

Figura 10 - Foto ilustrativa do kit Singlepath Salmonella

Enriquecimento seletivo: 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS), incubando-se a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$.

Realização do teste: 1 a 2 mL do caldo RVS foram aquecidos em água fervente por $15 \pm 1\text{ min}$ e em seguida resfriados até a temperatura ambiente. Cerca de 160 μL do caldo inativado foram transferidos para o poço circular do dispositivo, fazendo-se a leitura após 20 minutos. A resposta foi considerada presuntiva positiva quando houve o aparecimento de uma banda vermelha nas janelas T e C, e negativa quando houve o aparecimento da banda apenas na janela C. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

3.2.9. 1-2 Test (BioControl) (Figura 11)

O 1-2 Test é um método rápido qualitativo para detecção de espécies móveis de *Salmonella* spp em alimentos, ingredientes alimentares e amostras ambientais. Baseia-se na imobilização da *Salmonella* spp no meio de motilidade, através de anticorpos polivalentes H (flagelar). A imobilização de espécies móveis de *Salmonella* spp resulta na formação de uma imunobanda visível no alto da câmara de motilidade do kit.

Figura 11 - Esquema analítico do método 1-2 Test (BioControl).

Realização do teste: Para análise de alimentos processados, 1 gota da solução de iodo / iodeto que acompanha o kit foi adicionada à câmara de inoculação, agitando-se suavemente. Após remoção do plugue preto da câmara de inoculação, transferiu-se 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1.

Na análise de alimentos crus e com contaminação elevada, a etapa de adição de solução de iodo / iodeto à câmara de inoculação foi eliminada. Nestes casos, incluiu-se uma etapa de enriquecimento seletivo da amostra, transferindo-se 1 mL da cultura de pré-enriquecimento, preparada conforme descrito em 3.2.1., para um tubo contendo 10 mL de caldo Tetrationato Verde Brilhante (TGB) (Difco, 210430), com incubação a $(41 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. Para o teste, o conteúdo da câmara de inoculação foi descartado, preenchendo a câmara com 1,5 mL da cultura em caldo TGB.

Feita a inoculação da câmara de inoculação, a posição do kit foi invertida (com a tampa branca para cima). Após a remoção da tampa branca, a ponta plástica da tampa foi cortada e adicionou-se uma gota da solução de anticorpos anti-

Salmonella spp à câmara de motilidade. O kit foi então incubado à $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 14 à 30h, com a tampa branca para cima. A formação de uma zona branca (névoa) em forma de “U” na câmara de motilidade foi indicativa de um resultado positivo presuntivo. Eventuais resultados presuntivos positivos, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, foram confirmados conforme recomendado pelo fabricante.

3.3. Determinação do Limite de Detecção

O limite de detecção de *Salmonella* spp de cada um dos oito métodos utilizados no estudo foi determinado através da inoculação experimental de 3 diferentes matrizes alimentares (carne bovina, leite em pó integral e gelatina granulada), utilizando 5 níveis de inóculo. Previamente à inoculação, os produtos foram submetidos à pesquisa de *Salmonella* spp em 250g, para garantir que estavam isentos deste microrganismo, seguindo a metodologia ISO 6579:2002 descrita no item 3.2.2.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata com todos os kits simultaneamente.

3.3.1. Preparo das culturas para inoculação experimental

Preparou-se um “pool” de salmonelas com as seguintes cepas:

Salmonella Infantis – Isolada de lingüiça de frango.

Salmonella Typhimurium – Isolada de cortes de frango.

Salmonella Heidelberg – Isolada de cortes de peru.

Salmonella Enteritidis – Isolada de cortes de frango.

Estas cepas de salmonelas foram isoladas de alimentos analisados rotineiramente na SFDK e sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Para a inoculação experimental, a viabilidade e pureza das cepas foram verificadas através de semeadura em ágar TSA (Merck, 105458) e provas bioquímicas e sorológicas, conforme descrito em 3.2.2.

Cada cepa foi cultivada duas vezes seguidas em caldo TSB (Merck, 105459) por $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 24h. Em seguida, preparou-se um “pool”, misturando-se 1 mL de cada cultura. Para a determinação da concentração de salmonelas no pool, preparou-se diluições decimais seriadas em solução salina estéril, até se obter a diluição 10^{-8} . A partir desta diluição, foram transferidas em triplicata, porções de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mL para placas de Petri vazias, adicionando-se em seguida Ágar para Contagem Padrão (Merck), previamente fundido e resfriado a $45 - 46^{\circ}\text{C}$. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas em posição invertida a $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após a incubação, foi feita a contagem das colônias e a determinação do número de UFC/mL no “pool”.

3.3.2. Inoculação experimental

Foram pesadas 5 porções de 25 g de cada uma das matrizes utilizadas (carne bovina, leite em pó integral e gelatina granulada), que foram homogeneizadas em stomacher com 225 mL de Água peptonada tamponada.

Cada uma das cinco porções dos produtos foi contaminada experimentalmente com um dos seguintes volumes do “pool” de salmonelas diluído a 10^{-8} :

- Inóculo **A**: 0,10 mL
- Inóculo **B**: 0,25 mL
- Inóculo **C**: 0,50 mL
- Inóculo **D**: 1,0 mL
- Inóculo **E**: 2,5 mL

Após a contaminação experimental, as amostras foram homogeneizadas novamente em stomacher e submetidas à pesquisa de *Salmonella* spp pelos métodos descritos nos itens 3.2.2. a 3.2.9.

4 RESULTADOS

Considerando a metodologia ISO 6579:2002, 50 das 244 amostras de alimentos analisadas (20,5%) foram positivas para *Salmonella* spp (Tabela 7). A maior positividade foi observada no grupo “carnes e produtos cárneos”, onde 56,8% das amostras deste grupo de matrizes apresentaram positividade para *Salmonella* spp. O grupo denominado de “outros produtos” apresentou 25% de positividade, o de “farelo de soja” 20,5% e o de “frango, ovos e produtos avícolas” apresentou 10,5% de positividade.

Na Tabela 7, ainda, se pode verificar que das 50 amostras positivas para *Salmonella* spp, 21 pertenciam ao grupo de “carnes e produtos cárneos” (42%). O grupo de “frango, ovos e produtos avícolas”, com 15 amostras entre as 50 amostras positivas, correspondeu a 30% das amostras positivas para *Salmonella* spp encontradas, o grupo de “farelo de soja” 18% e o grupo de “outros produtos” 10%.

Na Tabela 8 estão listadas as amostras analisadas que apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp pela metodologia de referência adotada (ISO 6579:2002), bem como os resultados obtidos pelos demais métodos avaliados no estudo. Nessa tabela é possível verificar que somente 15 das 50 amostras positivas (30%) pela metodologia de referência foram simultaneamente positivas por todos os demais métodos avaliados, ressaltando-se que os resultados positivos são presuntivos. Neste estudo, os resultados positivos obtidos pelos métodos rápidos foram confirmados apenas naquelas amostras que apresentaram resultado negativo na metodologia ISO 6579:2002.

Os resultados analíticos dos oito métodos avaliados estão detalhados na Tabela 9. No cálculo da porcentagem de concordância dos resultados positivos de

cada um dos métodos rápidos avaliados com o resultado positivo obtido pela metodologia ISO 6579:2002, foram descontadas as amostras que não foram analisadas simultaneamente pelos dois métodos comparados. Nesta Tabela 9, verifica-se que nas condições em que o trabalho foi realizado, nas amostras analisadas sem contaminação experimental, os sistemas avaliados apresentaram as seguintes porcentagens de concordância com a positividade encontrada para o método ISO 6579:2002: VIDAS (SLM) 93,8%, BAX 92,0%, Transia 91,1%, VIP 81,3%, 1-2 Test 68,8%, Singlepath 68,1% e Unique 63,8%.

Na Tabela 9, é possível verificar também que todos os métodos rápidos detectaram amostras com resultados presuntivos positivos, mas que apresentaram resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002. Estas amostras foram submetidas aos testes de confirmação recomendados pelos respectivos fabricantes e os resultados presuntivos positivos não foram confirmados, caracterizando tais resultados como falso-positivos.

Outro ponto a destacar na Tabela 9 é que ocorreram alguns resultados considerados duvidosos, principalmente quando utilizados métodos rápidos de leitura visual. Assim, o método 1-2 Test apresentou resultados duvidosos em 3 amostras, o UNIQUE em duas e o Transia e o Singlepath em uma amostra.

Os resultados apresentados na Tabela 10 referem-se à porcentagem de concordância dos resultados presuntivos positivos obtidos pelos métodos rápidos com aqueles obtidos pela metodologia de referência, de acordo com a matriz alimentar analisada. Para as amostras dos grupos de “carnes e produtos cárneos” e de “frango, ovos e produtos avícolas”, nenhum dos métodos avaliados apresentou 100% de porcentagem de concordância com os resultados positivos para *Salmonella* spp obtidos pela metodologia ISO 6579:2002. No grupo de “farelo de soja”, foram

detectadas porcentagens de concordância de 44,5% (Singlepath) até 100% (BAX e VIDAS (SLM), enquanto no grupo de “outros produtos”, foram detectadas porcentagens de concordância de 75,0% (Singlepath) até 100% (VIDAS (SLM), Transia, Unique e VIP).

As Tabelas 11, 12, 13 e 14 apresentam detalhamento dos resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados nas amostras do grupo de “frango, ovos e produtos avícolas” (Tabela 11), nas amostras do grupo de “farelo de soja” (Tabela 12), nas amostras do grupo de “carnes e produtos cárneos” (Tabela 13) e nas amostras do grupo de “outros produtos” (Tabela 14). Essas tabelas, além de mostrar as porcentagens de concordância de resultados positivos para cada método rápido avaliado em relação aos resultados positivos obtidos pelo método de referência, mostram também que em todas as matrizes analisadas ocorreram entre 1% e 2% de resultados falso-positivos, mesmo que apenas presuntivos positivos e uma porcentagem variável de resultados falso-negativos.

Na Tabela 15, verifica-se que a porcentagem de resultados falso-negativos variou de zero até 55,6%. Pode se observar que a incidência de resultados falso-negativos para cada um dos métodos avaliados variou com a matriz alimentar analisada.

A Tabela 16 apresenta os resultados referentes à determinação do nível de detecção de cada um dos métodos avaliados. Verificou-se que o menor nível de contaminação detectável pelos diferentes métodos avaliados foi dependente da matriz alimentar em análise.

A Tabela 17 apresenta de maneira consolidada as respostas dos métodos avaliados na determinação do nível de detecção.

A Tabela 18 mostra as porcentagens de concordância dos resultados presuntivos positivos para *Salmonella* spp nos métodos rápidos avaliados em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002 em amostras de alimentos artificialmente contaminadas e amostras de alimentos sem contaminação experimental.

Tabela 7- Positividade encontrada para *Salmonella* spp nos diferentes grupos de amostras analisadas pela metodologia ISO 6579:2002

Grupos de amostras	Número de amostras analisadas	Positividade para <i>Salmonella</i> spp		Distribuição das amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp por grupo de matriz analisada
		Número de amostras positivas	Percentual de amostras positivas no grupo	
Frango, ovos e produtos avícolas	143	15	10,5%	30,0%
Farelo de soja	44	9	20,5%	18,0%
Carnes e produtos cárneos	37	21	56,8%	42,0%
Outros produtos	20	5	25,0%	10,0%
Total	244	50	20,5%	100,0%

Tabela 8 - Relação das amostras positivas para *Salmonella* spp pela metodologia ISO 6579:2002 e os resultados obtidos pelos demais métodos avaliados

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579:2002	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
002	Frango resfriado	positivo	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
028	Lingüiça	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
030	Lingüiça toscana	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
031	Lingüiça toscana	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
034	Lingüiça toscana	positivo	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
044	Carne mecanicamente separada	positivo	NEG	NEG	NR	POS	NR	NR	NR
051	Farinha de vísceras	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
052	Farinha de carne e osso 40%	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
053	Farinha de carne e osso 40%	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
054	Farinha de pena	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	RD
NEG= Resultado negativo		POS= Resultado positivo presuntivo		RD= Resultado duvidoso		NR= Análise não realizada			Continua

Continuação (Tabela 8)

		Métodos							
AMOSTRAS		ISO 6579:2002	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single- path	1-2 Test
055	Farinha de carne	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	RD
056	Farinha de carne e osso 40%	positivo	POS	NEG	POS	RD	NEG	POS	POS
057	Farinha de carne e osso 40%	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
058	Bolo	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
059	Bolo	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
060	Ovo em pó	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	RD
067	Frango a passarinho – 13	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
152	Carne bovina resfriada	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
153	Miúdos resfriados – aves	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
157	Frango resfriado – 02	positivo	POS	POS	NEG	NR	POS	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado positivo presuntivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (Tabela 8)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579:2002	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single- path	1-2 Test
158	Frango resfriado – 03	positivo	POS	POS	NEG	NR	POS	NEG	NEG
159	Frango resfriado – 04	positivo	POS	NEG	NEG	NR	POS	NEG	NEG
160	Frango resfriado – 05	positivo	POS	NEG	NEG	NR	POS	NEG	NEG
162	Ração – amostra 03	positivo	POS	NR	POS	POS	POS	NR	POS
164	Lingüiça frescal	positivo	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
165	Lingüiça frescal	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
166	Lingüiça frescal	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
170	Farelo de soja – 03	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG
171	Farelo de soja – 04	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
174	Farelo de soja – 07	positivo	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado positivo presuntivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (Tabela 8)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579:2002	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single- path	1-2 Test
175	Clara de ovo pasteurizada	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
178	Lingüiça frescal – 01	positivo	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS
202	Peru	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
203	Peru	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
205	Varredura	positivo	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
206	Farelo de soja	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
208	Farelo de soja	positivo	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
210	Farelo de soja	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
211	Farelo de soja	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
215	Farelo de soja	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado positivo presuntivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (Tabela 8)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579:2002	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
218	Farelo de soja	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
225	Peru	positivo	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
226	Lingüiça toscana	positivo	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
234	Farinha de sangue	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
236	Carne moída (acém)	positivo	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS
237	Lingüiça toscana	positivo	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
238	Carne moída (acém)	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
240	Cortes congelados de frango	positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
241	Carne sem osso resfriada de suíno	positivo	POS	NR	POS	NEG	POS	POS	POS
244	Ovo líquido	positivo	POS	NR	POS	POS	POS	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado positivo presuntivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Tabela 9- Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp nas amostras analisadas sem contaminação experimental.

	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	Transia	Vip	Single- path	1-2 Test	Unique
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	92,0%	93,8%	91,1%	81,3%	68,1%	68,8%	63,8%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	50 ^(f)	46	45	41	39	32	33	30
Resultados negativos ^(c)	194	190	37	40	36	39	37	95
Resultados falso-positivos ^(d)	Não aplicável	4	3	0	1	0	2	1
Resultados falso-negativos ^(e)	Não aplicável	4	3	3	9	15	12	17
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	1	0	1	3	2
Total de amostras analisadas	244	244	88	85	85	87	87	145
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado positivo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	2	5	2	3	2	3
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado negativo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	154	154	157	154	155	96

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, descontadas as amostras com resultado positivo pela ISO 6579:2002 mas não analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos coincidentes com os resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(d) Resultados presuntivos positivos pelos métodos avaliados, porem negativos nos testes de confirmação e negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(e) Resultados negativos pelos métodos avaliados, mas com resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(f) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados.

Tabela 10 - Porcentagem de concordância dos resultados presuntivos positivos para *Salmonella* spp nos métodos rápidos avaliados em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002, nos diferentes grupos de amostras analisadas

Grupos	Métodos						
	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Singlepath	1-2 Test
Frango, ovos e produtos avícolas	93,3%	64,3%	64,3%	90,9%	92,9%	57,2%	42,3%
Farelo de soja	100%	77,8%	88,9%	88,9%	100%	44,5%	55,6%
Carnes e produtos cárneos	90,5%	50,0%	85,0%	90,0%	90,0%	85,0%	90,0%
Outros produtos	80,0%	100%	100%	100%	100%	75,0%	80,0%

Tabela 11- Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp em frango, ovos e produtos avícolas

Frango, ovos e produtos avícolas	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	Transia	Unique	VIP	Single- path	1-2 Test
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	93,3%	92,9%	90,9%	64,3%	64,3%	57,2%	42,3%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	15 ^(f)	14	13	10	9	9	8	6
Resultados negativos ^(c)	128	126	7	8	37	6	8	7
Resultados falso-positivos ^(d)	Não aplicável	2	1	0	0	1	0	1
Resultados falso-negativos ^(e)	Não aplicável	1	1	1	5	5	6	7
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	0	1	0	0	1
Total de amostras analisadas	143	143	22	19	52	21	22	22
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado positivo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	1	4	1	1	1	1
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado negativo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	120	120	90	121	120	120

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, descontadas as amostras com resultado positivo pela ISO 6579:2002 mas não analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos coincidentes com os resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(d) Resultados presuntivos positivos pelos métodos avaliados, porém negativos nos testes de confirmação e negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(e) Resultados negativos pelos métodos avaliados, mas com resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(f) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados.

Tabela 12- Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp em farelo de soja

Farelo de soja	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	VIP	Transia	Unique	1-2 Test	Single- path
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	100%	100%	88,9%	88,9%	77,8%	55,6%	44,5%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	9 ^(f)	9	9	8	8	7	5	4
Resultados negativos ^(c)	35	34	19	20	20	35	19	20
Resultados falso-positivos ^(d)	Não aplicável	1	1	0	0	0	1	0
Resultados falso-negativos ^(e)	Não aplicável	0	0	1	1	2	4	5
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	0	0	0	0	0
Total de amostras analisadas	44	44	29	29	29	44	29	29
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado positivo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	0	0	0	0	0	0
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado negativo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	15	15	15	0	15	15

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, descontadas as amostras com resultado positivo pela ISO 6579:2002 mas não analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos coincidentes com os resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(d) Resultados presuntivos positivos pelos métodos avaliados, porém negativos nos testes de confirmação e negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(e) Resultados negativos pelos métodos avaliados, mas com resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(f) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados.

Tabela 13- Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp em carnes e produtos cárneos

Carnes e produtos cárneos	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	1-2 Test	Transia	VIP	Single- path	Unique
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	90,5%	90,0%	90,0%	90,0%	85,0%	85,0%	50,0%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	21 ^(f)	19	18	18	18	17	17	10
Resultados negativos ^(c)	16	16	4	5	5	5	4	13
Resultados falso-positivos ^(d)	Não aplicável	0	1	0	0	0	0	1
Resultados falso-negativos ^(e)	Não aplicável	2	2	1	1	3	3	10
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	1	1	0	1	1
Total de amostras analisadas	37	37	25	25	25	25	25	35
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado positivo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	1	1	1	1	1	1
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado negativo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	11	11	11	11	11	1

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, descontadas as amostras com resultado positivo pela ISO 6579:2002 mas não analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos coincidentes com os resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(d) Resultados presuntivos positivos pelos métodos avaliados, porém negativos nos testes de confirmação e negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(e) Resultados negativos pelos métodos avaliados, mas com resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(f) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados.

Tabela 14- Resultados analíticos dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp em outros produtos analisados

Outros produtos	ISO 6579:2002	Transia	VIDAS	VIP	BAX	1-2 Test	Unique	Single- path
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	100%	100%	100%	80,0%	80,0%	100%	75,0%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	5 ^(f)	5	5	5	4	4	4	3
Resultados negativos ^(c)	15	7	7	5	14	6	10	7
Resultados falso-positivos ^(d)	Não aplicável	0	0	0	1	0	0	0
Resultados falso-negativos ^(e)	Não aplicável	0	0	0	1	0	0	1
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	0	0	1	0	0
Total de amostras analisadas	20	12	12	10	20	11	14	11
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado positivo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	0	0	0	0	0	1	1
Amostras não analisadas entre aquelas com resultado negativo pela metodologia ISO 6579:2002	Não aplicável	8	8	10	0	9	5	8

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, descontadas as amostras com resultado positivo pela ISO 6579:2002 mas não analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos coincidentes com os resultados negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(d) Resultados presuntivos positivos pelos métodos avaliados, porém negativos nos testes de confirmação e negativos pela metodologia ISO 6579:2002

^(e) Resultados negativos pelos métodos avaliados, mas com resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(f) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados.

Tabela 15 - Resultados falso-negativos para *Salmonella* spp nos métodos rápidos avaliados em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002, nos diferentes grupos de amostras analisadas ^(a)

Grupos	Métodos						
	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Singlepath	1-2 Test
Frango, ovos e produtos avícolas	1 em 15 (6,6%)	5 em 14 (35,7%)	5 em 14 (35,7%)	1 em 11 (9,1%)	1 em 14 (7,2%)	6 em 14 (42,9%)	7 em 13 (53,8%)
Farelo de soja	0 em 9 0%	2 em 9 (22,2%)	1 em 9 (11,1%)	1 em 9 (11,1%)	0 em 9 (0%)	5 em 9 (55,6%)	4 em 9 (44,4%)
Carnes e produtos cárneos	2 em 21 (9,5%)	10 em 20 (50,0%)	3 em 20 (15,0%)	1 em 20 (5,0%)	2 em 20 (10,0%)	3 em 19 (15,8%)	1 em 19 (5,3%)
Outros produtos	1 em 5 (20,0%)	0 em 4 (0%)	0 em 5 (0%)	0 em 5 (0%)	0 em 5 (0%)	1 em 5 (25,0%)	0 em 4 (0%)
Total	4 em 50 (8,0%)	17 em 47 (35,4%)	9 em 48 (18,8%)	3 em 45 (6,7%)	3 em 48 (6,2%)	15 em 47 (31,9%)	12 em 45 (26,7%)

^(a) Valores calculados considerando as amostras analisadas pelo método avaliado em relação ao método ISO 6579:2002, descontando-se os resultados duvidosos.

Tabela 16 - Detecção de *Salmonella* spp por diferentes métodos, em amostras de carne, leite em pó integral e gelatina granulada, **artificialmente contaminadas** com um pool de cepas de *Salmonella* Enterica em 5 níveis de inóculo.

Inóculo (UFC/25g)	Matriz alimentar	Métodos							
		ISO	BAX	VIDAS	VIP	1-2 Test	UNIQUE	Single- path	Transia
0	Carne	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	Leite	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	Gelatina	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
1,0 (0 a 2)	Carne	Positivo	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
	Leite	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Gelatina	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
4,0 (2 a 7)	Carne	Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Leite	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Gelatina	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS

NEG= resultado negativo

POS= resultado presuntivo positivo

continua

Continuação (Tabela 16)

Inóculo (UFC/25g)	Matriz alimentar	Métodos							
		ISO	BAX	VIDAS	VIP	1-2 Test	UNIQUE	Single- path	Transia
9,3 (5 a 15)	Carne	Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
	Leite	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
	Gelatina	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
12,7 (10 a 17)	Carne	Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Leite	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Gelatina	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
33,3 (27 a 42)	Carne	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Leite	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
	Gelatina	Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
		Positivo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

NEG= resultado negativo

POS= resultado presuntivo positivo

Tabela 17- Resultados analíticos consolidados dos diferentes métodos avaliados na pesquisa de *Salmonella* spp em amostras de carne, leite em pó integral e gelatina granulada **artificialmente contaminadas** com um “pool” de cepas de *Salmonella* Enterica em 5 níveis de inóculo.

	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	Transia	Vip	Single- path	1-2 Test	Unique
Porcentagem de concordância ^(a)	100%	97,7%	100%	100%	93,2%	81,8%	95,5%	75,0%
Resultados presuntivos positivos ^(b)	44 ^(d)	43	44	44	41	36	42	33
Resultados negativos ^(c)	0	1	0	0	3	8	2	11
Resultados duvidosos	Não aplicável	0	0	0	0	0	0	0
Total de amostras analisadas	44	44	44	44	44	44	44	44

^(a) Porcentagem de concordância com a positividade encontrada pela metodologia ISO 6579:2002, nos 5 níveis de inóculo, em relação às amostras analisadas pelo método avaliado.

^(b) Resultados presuntivos positivos coincidentes com os resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002

^(c) Resultados negativos encontrados nas metodologias analisadas, nos 5 níveis de inoculo, nas diferentes amostras

^(d) Para o método ISO 6579:2002, estes resultados são positivos confirmados

Tabela 18- Porcentagem de concordância dos resultados presuntivos positivos para *Salmonella* spp nos métodos rápidos avaliados em relação aos resultados positivos pela metodologia ISO 6579:2002 em amostras de alimentos **sem contaminação experimental** e amostras de alimentos **artificialmente contaminadas**

	ISO 6579:2002	BAX	VIDAS	Transia	VIP	Single- path	1-2 Test	Unique
Amostras sem contaminação experimental	100%	92,0%	93,8%	91,1%	81,3%	68,1%	68,8%	63,8%
Amostras artificialmente contaminadas	100%	97,7%	100%	100%	93,2%	81,8%	95,5%	75,0%

5 DISCUSSÃO

De modo geral, os estudos de avaliação do desempenho de métodos alternativos para detecção rápida de *Salmonella* spp em alimentos publicados na literatura científica foram desenvolvidos com alimentos experimentalmente contaminados, trabalhando-se em condições laboratoriais artificiais. Este procedimento tem explicação na necessidade de se avaliar parâmetros como sensibilidade, especificidade, exclusividade e inclusividade, que somente podem ser determinados quando se tem um conhecimento dos microrganismos verdadeiramente presentes no alimento analisado, ou seja, quando se trabalha com alimentos aos quais se adicionam os microrganismos desejados (FENG, 1998). No entanto, para que o desempenho desses métodos em condições reais de uso possa ser avaliado, é necessário trabalhar com amostras sem contaminação experimental, empregando em paralelo algum método de referência, para fins de comparação dos resultados obtidos. No presente estudo, trabalhou-se com os dois tipos de alimentos, ou seja, alimentos sem contaminação experimental, selecionados entre os encaminhados para análise de rotina no laboratório onde o estudo foi realizado, e alimentos artificialmente contaminados. Estes foram constituídos de três matrizes alimentares diferentes, contaminadas com cinco níveis diferentes de inóculo de *Salmonella* spp, objetivando conhecer o nível de detecção de cada um dos métodos utilizados no estudo.

Segundo os critérios adotados nesse estudo, as porcentagens de concordância dos métodos rápidos avaliados em relação ao método ISO 6579:2002 foram calculadas considerando somente os resultados positivos obtidos. A concordância com resultados negativos não foi considerada, uma vez que o objetivo do trabalho era avaliar a eficiência dos métodos rápidos em detectar a presença de

Salmonella spp em amostras que fossem positivas pela metodologia de referência. É importante ressaltar que resultados positivos pelos métodos rápidos avaliados foram considerados presuntivos positivos, porque estes resultados não foram submetidos aos testes de confirmação recomendados pelos respectivos fabricantes, a menos que o resultado pelo método rápido tenha sido positivo e negativo pelo método de referência. Entretanto, o caráter “presuntivo” dos resultados positivos obtidos nesse estudo é diferente daquele que se obtém quando se emprega um método rápido isoladamente, pois as amostras positivas pelos métodos rápidos foram positivas pela metodologia de referência simultaneamente.

O método ISO 6579:2002 foi empregado como método de referência para detecção de *Salmonella* spp em alimentos devido à sua aceitação e utilização em diferentes países com os quais o Brasil mantém relações comerciais, conforme observado na demanda diária no laboratório de análises microbiológicas onde o estudo foi executado. Além disso, a AOAC considera o método ISO 6579:2002 equivalente ao método de cultura 995.20 (*Salmonella* in raw, highly contaminated foods and poultry feed), tendo como base o estudo colaborativo realizado em 2003 por Feldsine et al. Esses autores empregaram três tipos de alimentos artificialmente contaminados com diferentes níveis de *Salmonella*, que foram analisados simultaneamente por 21 laboratórios, verificando que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos (FELDSINE et al., 2003).

A seguir são apresentados comentários sobre os diferentes métodos rápidos avaliados nesse trabalho.

BAX Salmonella

De acordo com a Instrução Normativa N° 41, de 07 de junho de 2004, o sistema BAX é um método aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para pesquisa de *Salmonella* spp em alimentos e considerado “método alternativo equivalente ao método de referência do MAPA” (BRASIL, 2004). Por esta razão, o sistema BAX foi também utilizado para análise de todas as amostras que fizeram parte do estudo.

No presente estudo, foi observado que para as amostras sem contaminação experimental, o método BAX apresentou resultados positivos com concordância de 92% (Tabela 9) com os resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002. Das 50 amostras positivas pelo método ISO 6579:2002, 46 foram positivas também pelo BAX e 4 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Foram detectadas também quatro amostras positivas pelo BAX, mas negativas pelo método ISO 6579:2002; estas, quando submetidas aos testes de confirmação, tal como preconizado pelo fabricante, apresentaram resultados negativos. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos no sistema BAX em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 100% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 93,3% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 90,5% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 80% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o método BAX apresentou resultados positivos com concordância de 97,7% (Tabela 17) com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002. Das 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002, uma apresentou resultado negativo pelo BAX (matriz Carne, no nível de inoculação 1,0 UFC / 25g).

Os resultados obtidos nesse estudo em relação ao BAX foram muito próximos dos reportados em 2003 por Silbernagel et al. No estudo destes autores, o BAX foi submetido a um estudo multilaboratorial comparando-o ao método convencional de cultura da AOAC, através de análises em cinco matrizes alimentares artificialmente contaminadas com três níveis de inóculo de *Salmonella* (salsichas, carne moída crua, queijo mussarela, peixe cru congelado e suco de laranja), e mais uma matriz sem contaminação experimental (carne crua de frango). No total, foram analisadas 1.188 amostras, das quais 472 foram positivas para *Salmonella* spp pelo método de cultura, e dessas, 11 não foram detectadas pelo BAX. Considerando o mesmo critério adotado no presente estudo, a porcentagem de concordância dos resultados positivos no estudo de Silbernagel et al. (97,7%) foi a mesma encontrada nesse trabalho para as amostras artificialmente contaminadas, porém, mais alta que a encontrada nas amostras sem contaminação experimental. As diferenças encontradas podem ser associadas aos tipos de matrizes analisadas e ao fato de que os autores trabalharam predominantemente com alimentos artificialmente contaminados (SILBERNAGEL et al., 2003).

VIDAS Salmonella (SLM)

Em relação ao desempenho do sistema VIDAS (SLM), para as amostras sem contaminação experimental, este método apresentou resultados positivos com concordância de 93,8% (Tabela 9) com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002. Das 48 amostras positivas analisadas simultaneamente pelo método ISO 6579:2002 e o método VIDAS (SLM), 45 amostras foram positivas para ambos os métodos e 3 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Por outro lado, foram detectadas também 3 amostras positivas pelo método VIDAS (SLM), mas

negativas pelo método ISO 6579:2002; estas quando submetidas aos testes de confirmação, tal como preconizado pelo fabricante, apresentaram resultados negativos. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos na metodologia VIDAS (SLM) em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 100% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 92,9% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 90,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 100% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o método VIDAS (SLM) apresentou resultados positivos com concordância de 100% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). As 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002 também foram positivas pelo método VIDAS (SLM), independentemente da matriz alimentar.

Esses resultados são similares ao reportados por Hammack et al. em 2004, que avaliaram o método VIDAS (SLM) em relação ao método de cultura convencional (995.20), analisando 60 amostras de melões Cantaloupe artificialmente contaminados por ambos os métodos. O método VIDAS (SLM) e o método tradicional foram concordantes, ambos detectaram 37 amostras positivas em 37 amostras positivas para *Salmonella* spp (100%). Esses valores são coincidentes com os resultados encontrados nas amostras artificialmente contaminadas utilizadas nesse estudo, porém, mais altos que os encontrados nas amostras sem contaminação experimental. As diferenças encontradas podem ser associadas aos tipos de matrizes analisadas e ao fato dos autores terem trabalhado com alimentos artificialmente contaminados (HAMMACK et al., 2004).

Também Yeh et al. em 2002, compararam o método VIDAS (SLM) ao método de referência, analisando 257 amostras de esponjas aplicadas em carcaças de porcos. O método VIDAS SLM e o tradicional detectaram 18 amostras positivas para *Salmonella* spp (100%), mas o método VIDAS SLM detectou também 4 amostras com resultados falso-positivos (1,7%), ou seja, 4 amostras com resultados positivos pelo método VIDAS SLM, mas que foram negativos pelo método de referência. Duzentos e trinta e cinco amostras foram negativas por ambos os métodos (YEH et al., 2002). No presente estudo, a porcentagem de resultados falso-positivos (1,5%) nas amostras sem contaminação experimental foi a mesma detectada no estudo mencionado.

Transia Plate Salmonella Gold

Em relação aos resultados positivos para *Salmonella* spp encontrados pela metodologia Transia nas amostras sem contaminação experimental, verificou-se concordância de 91,1% (Tabela 9) com a positividade encontrada pelo método ISO 6579:2002. Das 45 amostras positivas testadas simultaneamente pelo método ISO 6579:2002 e pela metodologia Transia, foram positivas pelos dois métodos 41 amostras, 3 amostras apresentaram resultados falso-negativos e uma amostra apresentou resultado duvidoso. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos na metodologia Transia em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 88,9% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 90,9% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 90,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 100% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, os resultados positivos obtidos pelo método Transia foram 100% concordantes com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). As 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002 também foram positivas pelo método Transia, independentemente da matriz testada.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que tivessem informações sobre o desempenho da metodologia Transia para detecção de *Salmonella* spp em alimentos, impossibilitando uma avaliação comparativa dos resultados obtidos nesse estudo. Esses resultados são, portanto, inovadores e de importância para uma futura utilização desse método rápido na pesquisa de *Salmonella* spp em alimentos.

VIP Salmonella

Em relação à metodologia VIP, a concordância dos resultados positivos com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 nas amostras sem contaminação experimental foi de 81,3% (Tabela 9). Das 48 amostras positivas pelo método ISO 6579:2002 também analisadas pela metodologia VIP, 39 foram positivas pelos dois métodos e 9 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Foi detectada também 1 amostra com resultado presuntivo positivo pelo método VIP e negativa pelo método ISO 6579:2002, mas, quando submetida à confirmação recomendada pelo fabricante, o resultado foi negativo. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos na metodologia VIP em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 88,9% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 64,3% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 85,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 100% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o método VIP apresentou resultados positivos com concordância de 93,2% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). Das 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002, 41 amostras foram positivas e 3 amostras foram negativas pelo método VIP (1 resultado negativo na matriz Carne, no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g, 1 resultado negativo na matriz Carne, no nível de inóculo 4,0 UFC / 25g e 1 resultado negativo na matriz Gelatina, no nível de inóculo 33,3 UFC / 25g).

O método VIP *Salmonella* foi avaliado em um estudo colaborativo realizado por Feldsine et al. em 2000, no qual esse kit foi comparado ao método de cultura da AOAC para detecção de *Salmonella* spp em seis matrizes alimentares experimentalmente contaminadas com dois níveis diferentes de *Salmonella* spp (1 a 5 células / 25g e 10 a 50 células / 25g). Considerando o total de resultados positivos e negativos do estudo (n=1306), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos, mas verificou-se que das 560 amostras positivas para *Salmonella* spp pelo método de cultura, 100 (17,9%) não foram detectadas pelo kit (FELDSINE et al., 2000). No presente estudo, a porcentagem de amostras positivas não detectadas pelo método VIP *Salmonella* foi bastante próxima da observada no estudo de Feldsine et al. (18,7%), embora tenha variado de acordo com a matriz alimentar analisada (Tabela 9). Ressalte-se que é possível que o nível de contaminação das amostras analisadas tenha sido inferior à concentração mínima que esse método mostrou ser capaz de detectar.

Singlepath Salmonella

Para as amostras sem contaminação experimental, a metodologia Singlepath apresentou resultados positivos com concordância de 68,1% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 9). Das 47 amostras positivas pelo método ISO 6579:2002 também analisadas pelo Singlepath, 32 foram positivas pelos dois métodos, mas 15 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos na metodologia Singlepath em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 44,5% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 57,2% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 85,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 75,0% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o método Singlepath apresentou resultados positivos com concordância de 81,8% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). Das 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002, 36 amostras foram positivas e 8 amostras foram negativas pelo método Singlepath (2 resultados negativos na matriz Carne, no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g, 2 resultados negativos na matriz Leite, no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g, 1 resultado negativo na matriz Gelatina, no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g, 1 resultado negativo na matriz Carne, no nível de inóculo 4,0 UFC / 25g, 1 resultado negativo na matriz Gelatina, no nível de inóculo 4,0 UFC / 25g e 1 resultado negativo na matriz Carne, no nível de inóculo 9,3 UFC / 25g).

Os resultados obtidos no presente estudo, para o Singlepath são diferentes dos reportados por Thompson & Lindhart em 2006, que verificaram que as taxas de resultados falso-positivos e falso-negativos foram apenas 7,3% e 2,5% respectivamente, quando o método ISO 6579:2002 foi utilizado como método de

referência. Esses autores trabalharam com sete matrizes alimentares diferentes, (leite em pó, pimenta do reino, ração de animais, coco desidratado, ameixas cozidas congeladas, carne moída e carne de peru) experimentalmente inoculadas com dois níveis de *Salmonella* (0,23 a 1,8 UFC/25g e 2,3 a 6,0 UFC/25g). Os resultados observados por esses autores são diferentes dos obtidos nesse estudo, certamente porque foram utilizadas matrizes experimentalmente contaminadas e com características bastante diferentes das analisadas neste trabalho (THOMPSON & LINDHART, 2006). No presente estudo, verificou-se que o método Singlepath não detectou a presença de *Salmonella* spp em oito das 44 amostras artificialmente contaminadas, indicando que, em vários casos, a sensibilidade do método não foi suficiente para detectar concentrações inferiores a 9,3 UFC/25g de produto.

1-2 Test

Nas amostras sem contaminação experimental, a metodologia 1-2 Test apresentou resultados positivos com concordância de 68,8% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 9). Das 48 amostras positivas pelo método ISO 6579:2002 analisadas também pelo 1-2 Test, 33 foram positivas também pelo 1-2 Test e 12 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Foram detectadas também 2 amostras com resultados positivos pelo método 1-2 Test, mas negativos pelo método ISO 6579:2002, que quando submetidos aos testes de confirmação recomendados pelo fabricante, deram resultado negativo. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos na metodologia 1-2 Test em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 55,6% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 42,3% no grupo de

matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 90,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 80,0% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o método 1-2 Test apresentou resultados positivos com concordância de 95,5% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). Das 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002, 42 amostras foram positivas e 2 amostras foram negativas pelo método 1-2 Test (1 resultado negativo na matriz Carne, no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g e 1 resultado negativo na matriz Leite, no nível de inóculo 9,3 UFC / 25g).

Resultados similares foram reportados por Warburton et al. em 1994, que compararam a eficiência do 1-2 Test com o método de cultura preconizado pelo “Bacteriological Analytical Manual” (BAM), trabalhando com 417 amostras de farinha animal e frango cru em pedaços, como amostras naturalmente contaminadas e 130 amostras de camarões crus como amostras artificialmente contaminados com *Salmonella* Montevideo, nos níveis de 1 a 5 células / 25g e de 10 a 50 células / 25g, além de 65 controles negativos. Do total de 612 amostras, 328 foram positivas e 242 foram negativas por ambos os métodos. O 1-2 Test detectou 16 amostras positivas, que foram negativas pelo método de referência. Outras 25 amostras foram negativas pelo método 1-2 Test, mas foram positivas pelo método de referência. O estudo indicou 93,1% de concordância entre o método 1-2 Test e aquele descrito no BAM. Tal valor se aproxima do encontrado no presente estudo (95,5%) para as amostras artificialmente contaminadas (WARBURTON et al., 1994).

Em 2003, Erdman & Harris avaliaram o método 1-2 Test para detecção de salmonelas em amostras de fezes de suínos, comparando-o com o método de cultura tradicional. Os testes foram realizados com amostras de fezes obtidas em

chiqueiros, e também swabs retais, naturalmente e artificialmente contaminadas com *Salmonella* Typhimurium previamente isolada de fezes de suíno. Constatou-se que *S. Typhimurium* foi detectada por ambos os métodos em amostras contendo acima de 10^4 UFC/g. Das amostras experimentalmente contaminadas, 60% foram positivas pelo método tradicional e 85% pelo 1-2 Test, ou seja, o método 1-2 Test foi mais eficiente que o método de cultura (ERDMAN & HARRIS, 2003)

TECRA UNIQUE SALMONELLA

No que diz respeito ao UNIQUE, nas amostras sem contaminação experimental, este método apresentou resultados positivos com concordância de 63,8% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 9). Das 47 amostras positivas pelo método ISO 6579:2002 também testadas pelo UNIQUE, foram positivas 30 amostras pelos dois métodos e 17 amostras apresentaram resultados falso-negativos. Foi detectada também 1 amostra com resultado positivo pelo UNIQUE, mas negativa pelo método ISO 6579:2002, que não foi confirmada quando se empregou os testes de confirmação recomendados pelo fabricante. Conforme apresentado nas Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14, a concordância de resultados positivos pelo UNIQUE em relação aos resultados positivos obtidos pelo método ISO 6579:2002 foi de 77,8% no grupo de matrizes “farelo de soja”, 64,3% no grupo de matrizes “frango, ovos e produtos avícolas”, 50,0% para o grupo de “carnes e produtos cárneos” e de 100% no grupo de matrizes “outros alimentos”.

Quando se trataram das amostras artificialmente contaminadas, o UNIQUE apresentou resultados positivos com concordância de 75,0% com aqueles obtidos pelo método ISO 6579:2002 (Tabela 17). Das 44 amostras positivas pela metodologia ISO 6579:2002, 33 amostras foram positivas e 11 amostras foram

negativas pelo UNIQUE, todas estas na matriz Carne (3 resultados negativos no nível de inóculo 1,0 UFC / 25g, 2 resultados negativos no nível de inóculo 4,0 UFC / 25g, 3 resultados negativos no nível de inóculo 9,3 UFC / 25g, 2 resultados negativos no nível de inóculo 12,7 UFC / 25g e 1 resultado negativo no nível de inóculo 33,3 UFC / 25g). Esses resultados falso-negativos sugerem que o UNIQUE pode não ser capaz de detectar a presença de *Salmonella* spp nessas matrizes quando a concentração do patógeno é baixa.

Em 2004, Hammack et al. avaliaram o UNIQUE na recuperação de *Salmonella* spp da superfície de melões Cantaloupe artificialmente contaminados. O UNIQUE detectou menor número de amostras positivas para *Salmonella* spp do que o método tradicional. O UNIQUE detectou 16 amostras positivas em 29 amostras positivas para *Salmonella* spp (55%) (HAMMACK et al., 2004).

Em 2002, Paula et al. também investigaram a ocorrência da *Salmonella* spp em diversos alimentos de origem animal, usando métodos rápidos, entre eles o UNIQUE, comparando-os com os métodos de rotina adotados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, no Brasil. O estudo foi realizado com 200 amostras de alimentos de origem animal, incluindo amostras de bovinos, galinhas, carne de porco, miúdos (rim, coração, fígado, papo, baço, sangue, língua e intestino), peixes e ostras. Foram encontradas 34 amostras positivas pelo método de cultura utilizado no Instituto Adolfo Lutz e 27 amostras positivas pelo UNIQUE, resultando em um índice de concordância de positividade de 80% com o método de referência (PAULA et al., 2002).

Em 1996, Poppe & Duncan compararam a eficiência da pesquisa de *Salmonella* spp pelo UNIQUE e pelo Rappaport-Vassiliadis modificado semi-sólido (RVSM) em 100 amostras de carcaça de frango e carne de frango mecanicamente

separada (CMS). Os resultados evidenciaram 36 amostras positivas pelo UNIQUE, sendo que em 9 delas o resultado foi de difícil interpretação. Um resultado positivo não foi confirmado. Das amostras analisadas pelo método RVSM, 59 resultados foram positivos para *Salmonella* spp e 35 pelo UNIQUE, ou seja, um índice de concordância de positividade de 59% (POPPE & DUNCAN, 1996)

Em 2007, Cheung et al. avaliaram a eficiência do BAX e UNIQUE para pesquisa de *Salmonella* spp em amostras de carnes cruas de porco e de frango, sushi, sashimi, sanduíches, sobremesas e outros alimentos prontos para consumo. Tais amostras foram experimentalmente contaminadas com diferentes sorovares de salmonela, empregando o método tradicional de cultura como método de referência. As amostras artificialmente contaminadas com 10^2 UFC/g de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Derby* apresentaram resultados positivos pelos 2 métodos testados e também pelo método tradicional. Em 13 amostras de alimentos contaminados somente com *S. Typhi*, 4 apresentaram resultados negativos pelo UNIQUE (amostras de porco assado, ostra cru, tomate cereja e sushi de salmão) e 2 amostras apresentaram resultados negativos pelo método tradicional (porco assado e enguia grelhada) (CHEUNG et al., 2007).

Em relação às diferenças nos resultados positivos para *Salmonella* spp observadas nos diferentes métodos rápidos utilizados nesse estudo, quando se trabalhou com alimentos sem contaminação experimental e com aqueles inoculados artificialmente (Tabela 18), comprovou-se que em alimentos experimentalmente contaminados é pouco provável que seja possível reproduzir o grau de estresse induzido a esses microrganismos quando naturalmente presentes em um alimento. É sabido que microrganismos sob condições de estresse podem apresentar alterações

substanciais em suas características bioquímicas, metabólicas e genéticas originais, com implicações óbvias no desempenho dos métodos utilizados para sua detecção e identificação (ADAMS, 2005).

Nos estudos existentes quanto à validação das metodologias avaliadas, é de se esperar que as condições nas quais os trabalhos foram desenvolvidos tenham sido diferentes daquelas encontradas neste estudo. Este ocorreu conforme as condições normais de um laboratório de análises de alimentos, que analisa rotineiramente as mais variadas categorias de alimentos, com diferentes níveis de contaminação e com grau de estresse microbiano desconhecido.

Finalizando, acrescente-se que as amostras a serem analisadas chegam ao laboratório em diferentes horários, e coexistem diferentes necessidades de rapidez na disponibilização dos resultados. Na Figura 12, apresenta-se um esquema ilustrativo do tempo necessário para realização das metodologias utilizadas, que poderá ser de grande auxílio quando da implantação destas em um laboratório de análises microbiológicas de alimentos.

Métodos	DIA 01		DIA 02		DIA 03		DIA 04		DIA 05	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
ISO 6579:2002 ^(a)		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		semeadura em placas		identificação bioquímica		confirmação sorológica	
BAX		pré-enriquecimento	teste							
Unique <i>Salmonella</i>		pré-enriquecimento	teste							
VIP		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		teste ^(b)					
Transia		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		teste					
VIDAS		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		teste					
SinglePath		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		teste					
1-2 Test		pré-enriquecimento	enriquecimento seletivo		teste ^(c)					

^(a) Quando houver presença de colônias suspeitas após a semeadura em placas, realizam-se identificação bioquímica e confirmação sorológica

^(b) Previamente à inoculação no teste, executa-se ainda um pós enriquecimento

^(c) O resultado pode aparecer no período de 14 até 30 h

Figura 12 - Esquema ilustrativo do tempo necessário para realização das metodologias utilizadas

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que este presente trabalho foi desenvolvido pode-se concluir que:

- o desempenho dos métodos rápidos avaliados na detecção de *Salmonella* spp em alimentos sem contaminação experimental pode diferir substancialmente daquele apresentado em alimentos artificialmente contaminados;
- os métodos rápidos avaliados devem ser utilizados unicamente para fins de triagem, sendo que uns têm maior capacidade do que outros para indicar em curto espaço de tempo quais amostras de alimento poderiam estar contaminadas com *Salmonella* spp;
- os métodos rápidos avaliados podem apresentar resultados falso-positivos, em porcentagens que variam de acordo com a matriz alimentar analisada, ou seja, podem indicar falsamente a presença de *Salmonella* spp, implicando na necessidade de confirmação do resultado antes da liberação do resultado final. O laboratório deverá estar capacitado para o atendimento destas situações;
- os métodos rápidos avaliados podem dar resultados falso-negativos, portanto apresentam o perigo de não detectar *Salmonella* spp, eventualmente presente, nas amostras analisadas, levando à liberação de resultados equivocados;

- o desempenho dos métodos rápidos avaliados pode variar com a matriz alimentar analisada. Assim, a seleção do método rápido a ser utilizado para a pesquisa de *Salmonella* spp, em um dado tipo de alimento depende de uma avaliação prévia de seu desempenho nesse tipo de alimento;
- a adoção de um método rápido para detectar *Salmonella* spp em determinada matriz alimentar tem um risco intrínseco. A seleção de um dado método rápido só deve ser feita após a determinação do grau de risco que se queira assumir.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, M. Detecting sublethally damaged cells. In: GRIFFITHS, M. ed **Understanding pathogen behaviour**. Cambridge: CRC Press 2005, p199-212.

ANDREWS, W.; HAMMACK, T.S. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998. cap.5, p1-19. (Revision A).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Laboratory quality assurance. In: _____. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000. v.1.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Research Institute. Test Kit Database. **Performance tested methods**. 2008. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>. Acesso em: 15 abr. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Rapid test kits**. 2003. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/microbiologykits.htm#Salmonella>. Acesso em: 15 abr. 2008.)

BRASIL. Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.41, de 07 de junho de 2004. Oficializa a validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais - A-BAX® para detecção de *Salmonella spp* em amostras de alimentos, água e amostras ambientais - swab como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.113, 16 Jun. 2004. Seção 1, p.3.

CLARK, M. Food Poisoning Lawyer e Attorney - Food Poisoning Blog. **Salmonella Oranienburg Outbreak from Fruit Salad**. Disponível em: <http://www.foodpoisonblog.com/2007/10/articles/foodborne-illness-outbreaks/salmonella-oranienburg-outbreak-from-fruit-salad/>. Acesso em: 17 out. 2007.

CHEUNG, P.Y.; KWOK, K.K.; KAM, K.M. Application of BAX system, Tecra Unique *Salmonella* test, and a convencional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.219-227, 2007.

COHEN, M.L.; TAUXE, R.V. Drug-resistant Salmonella in the United States: An epidemiologic perspective. **Science** v. 234, p.964-969, 1986.

* De acordo com a NBR 6023:2000 preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

ELEY, R. Intoxicaciones alimentarias de etiologia microbiana. Zaragoza: Acribia, 1994. p.17-40.

ERDMAN, M.M., HARRIS, D.L. Detection of *Salmonella*: Evaluation for the 1-2 test for detecting *Salmonella* in swine feces. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 518-521, 2003.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Salmonella Nomenclature.** Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>. Acesso em: 13 fev. 2008.

FELDSINE, P.; MUI, L.A.; FORGEY, R.L.; KERR, D.E. Equivalence of Visual Immunoprecipitate Assay (VIP) for *Salmonella* for the detection of motile and nonmotile *Salmonella* in all foods by the AOAC culture method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.83, n.4, p.888-902, 2000.

FELDSINE, P.; LIENAU, H.; LEUNG, S.; MUI, L. Detection of *Salmonella* in Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 *Salmonella* Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.86, n.2, p.275-295, 2003.

FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: FDA, 1998. Appendix 1. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a1.html>. Acesso em: 12 jan. 2008.

FENG, P. Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. cap.43, p.911-934.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; BRANCHER, I.; GOULARTE, L. Visão geral sobre novos métodos em microbiologia de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.45-52, 1992.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, n.2, p.229-234, 2000.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FUNG, D.Y. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. **Food Reviews International**, v.10, n.3, p.357-375, 1994.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

GIESE, J. Rapid microbiology testing kits and instruments. **Food Technology**, v.49, n.7, p.64-71, 1995.

GRIFFITHS, M.W. Rapid methods for assessing microbiological quality of foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.3, n.4, p.291-308, 1995.

HAMMACK, T.S.; VALENTIN-BOM, I.E.; JACOBSON, A.P.; ANDREWS, W.H. Relative effectiveness of the bacteriological analytical manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. **Journal of Food Protection**, v.67, n.5, p.870-877, 2004.

HINTON, M., THRELFALL, E.J., ROWE, B. The invasive potential of *Salmonella* enteritidis phage types for young chickens. **Letters in Applied Microbiology**. V.10, p. 237-239, 1990.

HORWITZ, M.A., POLLARD, R.A., MERSON, M.H. A large outbreak of foodborne salmonellosis on the Navajo Indian Reservation, epidemiology and secondary transmission. **American Journal of Public Health**, v.67, p.1071-1076, 1977.

JAY, M.J. **Modern food microbiology**. 6.ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 679p. (Aspen Food Science Text Series).

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.2, p.127 -131, 1995.

LE MINOR, L. Genus III *Salmonella*. In: HOLT, J.G.; BERGEY, D.H.; KRIEG, N.R., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.427-458.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1998 - 2002. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.SS10, p.1-34, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>. Acesso em: 15 abr. 2008.

NARDVORNY, A., FIGUEIREDO, D.M.S., SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

NEW ZEALAND. Food Safety Authority. **Non-Typhoid *Salmonellae***. Disponível em: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf>. Acesso em: 18 out. 2007.

OLSON, W.P., ed. **Automated microbial identification and quantification: technologies for the 2000s**. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1996. 397p.

PARISH, M.E. Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in a salmonellosis outbreak. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 280-284, 1998.

PATEL, P., ed. **Rapid analysis techniques in food microbiology**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. 294p.

PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S.; LANDGRAF, M.; DESTRIO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Detection of *Salmonella* in food using TECRA *Salmonella* VIA and TECRA *Salmonella* Unique rapid immunoassays and a cultural procedure. **Journal of Food Protection**, v.65, n.3, p.552-556, 2002.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.2, 517p.

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.

POPPE, C.; DUNCAN, C.L. Comparison of detection of *Salmonella* by the Tecra UNIQUE *Salmonella* test and the modified Rappaport Vassiliadis medium. **Food Microbiology**, v.13, p.75-81, 1996.

RYAN, C.A. NICKELS, M.K., HARGRETT-BEAN, N.T. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. **Journal of the American Medical Association**, v.1258, p.3269-3274, 1987.

SILBERNAGEL, K.; JECHOREK, R.; CARVER, C. Evaluation of the Bax System for detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.86, n.6, p.1149-1159, 2003.

THOMPSON, L.; LINDHART, C. Singlepath *Salmonella*: performance-tested method. **Journal of AOAC International**, v.89, n.2, p.417-432, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N., coords. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p. (Biblioteca biomédica).

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Disease Listing. Salmonellosis. **Salmonellosis - Outbreak**

Investigation, October 2006. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/outbreak_notice.htm. Acesso em: 17 out. 2007

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Estimated attribution for meat, poultry, and eggs based on numbers of culture confirmed human Salmonellosis cases, 1998-2003. In: _____. **A statistical model for attributing human salmonella to meat, poultry, and eggs**. S.I.: Food Safety Summit. Attributing Illness to Food, 2007. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PPT/RBI_quo.ppt#278,11,. Acesso em: 14 jan. 2008.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Disease Listing. Salmonellosis. **Salmonellosis - Outbreak Investigation, February 2007a.** Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2007/outbreak_notice.htm. Acesso em: 17 out. 2007.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella Wandsworth Outbreak Investigation, June - July 2007b.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/wandsworth.htm>. Acesso em: 17 out. 2007.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation of Outbreak of Human Infections Caused by Salmonella [4.15].12:i:-. 2007c** Disponível em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/4512eyeminus.html>. Acesso em: 17 out. 2007.

WARBURTON, D.W.; FELDSINE, P.; FALBO-NELSON, M.T. Modified immunodiffusion method for detection of *Salmonella* in raw fresh and highly contaminated foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.78, n.1, p.59-68, 1994.

YEH, K.; TSAI, C.; CHEN, S.; LIAO, C. Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. **Journal of Food Protection**, v.65, n.10, p.1656-1659, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1- Relação de amostras e resultados analíticos obtidos na pesquisa de *Salmonella* spp por diferentes métodos, em diferentes matrizes naturalmente contaminadas.

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
001	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
002	Frango resfriado	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
003	Espetinho de filé suíno	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
004	Pernil	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
005	Lingüiça toscana	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
006	Lingüiça de pernil	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
007	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
008	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
009	Lingüiça de pernil	NEG	NEG	RD	NR	NR	NR	NR	NR
010	Lingüiça toscana	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
011	Carne congelada suíno sem osso	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
012	Carcaça de frango congelada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
013	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
014	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
015	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
016	Peru	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
017	Cortes de frango congelado (coxa)	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
018	Cortes de peru congelado (coxa)	NEG	NEG	RD	NR	NR	NR	NR	NR
019	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
020	Lingüiça toscana	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
021	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
022	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
023	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
024	Miúdos de peru	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
025	Chumbinho pescado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
026	Queijo parmesão ralado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
027	Peru temperado congelado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
028	Lingüiça	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
029	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
030	Lingüiça toscana	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
031	Lingüiça toscana	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
032	Carcaça de frango resfriada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
033	Lombo suíno	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
034	Lingüiça toscana	POS	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
035	Hambúrguer de carne bovina	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
036	Carne suína	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
037	Lingüiça de frango	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
038	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
039	Pizza	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
040	Carcaça de peru	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
041	Carne mecanicamente separada	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
042	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
043	Sururu catado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
044	Carne mecanicamente separada	POS	NEG	NEG	NR	POS	NR	NR	NR
045	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
046	Clara de ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
047	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
048	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
049	Frango resfriado	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
050	Carcaça de peru	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos						
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path 1-2 Test
051	Farinha de vísceras	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
052	Farinha de carne e osso 40%	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
053	Farinha de carne e osso 40%	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
054	Farinha de pena	POS	POS	POS	POS	POS	POS	RD
055	Farinha de carne	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	RD
056	Farinha de carne e osso 40%	POS	POS	NEG	POS	RD	NEG	POS
057	Farinha de carne e osso 40%	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
058	Bolo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
059	Bolo	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
060	Ovo em pó	POS	POS	POS	POS	POS	POS	RD

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
061	Frango a passarinho – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
062	Frango a passarinho – 03	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
063	Frango a passarinho – 04	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
064	Frango a passarinho – 05	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
065	Frango a passarinho – 09	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
066	Frango a passarinho – 11	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
067	Frango a passarinho – 13	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
068	Frango a passarinho – 14	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
069	Frango a passarinho – 15	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
070	Frango a passarinho – 16	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
AMOSTRAS		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
071	Moela – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
072	Moela – 02	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
073	Moela – 03	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
074	Moela – 04	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
075	Moela – 05	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
076	Moela – 10	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
077	Moela – 11	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
078	Moela – 16	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
079	Moela – 17	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
080	Moela – 18	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
081	Hamburguer de frango – 02	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
082	Hamburguer de frango – 04	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
083	Hamburguer de frango – 05	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
084	Hamburguer de frango – 08	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
085	Hamburguer de frango – 11	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
086	Hamburguer de frango – 12	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
087	Hamburguer de frango – 15	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
088	Hamburguer de frango – 17	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
089	Hamburguer de frango – 18	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
090	Hamburguer de frango - 20	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
091	Fígado de frango – bandeja – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
092	Fígado de frango – bandeja – 07	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
093	Fígado de frango – bandeja – 09	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
094	Fígado de frango – bandeja – 13	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
095	Fígado de frango – bandeja – 14	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
096	Fígado de frango – bandeja – 21	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
097	Fígado de frango – bandeja – 22	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
098	Fígado de frango – bandeja – 25	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
099	Fígado de frango – bandeja – 27	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
100	Fígado de frango – bandeja – 28	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS**= Resultado presuntivo positivo **RD**= Resultado duvidoso **NR**= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							1-2 Test
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	
101	Fígado de frango – saco – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
102	Fígado de frango – saco – 02	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
103	Fígado de frango – saco – 05	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
104	Fígado de frango – saco – 06	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
105	Fígado de frango – saco – 07	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
106	Fígado de frango – saco – 08	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
107	Fígado de frango – saco – 09	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
108	Fígado de frango – saco – 10	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
109	Fígado de frango – saco – 13	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
110	Fígado de frango – saco – 14	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo POS= Resultado presuntivo positivo RD= Resultado duvidoso NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
111	Fígado de frango – saco – 17	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
112	Carne de frango moída – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
113	Carne de frango moída – 02	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
114	Carne de frango moída – 03	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
115	Carne de frango moída – 04	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
116	Carne de frango moída – 05	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
117	Carne de frango moída – 06	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
118	Carne de frango moída – 07	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
119	Carne de frango moída – 08	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
120	Carne de frango moída – 10	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo POS= Resultado presuntivo positivo RD= Resultado duvidoso NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
121	Carne de frango moída - 13	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
122	Lingüiça de frango - 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
123	Lingüiça de frango – 02	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
124	Lingüiça de frango – 05	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
125	Lingüiça de frango – 06	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
126	Lingüiça de frango – 07	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
127	Lingüiça de frango – 08	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
128	Lingüiça de frango – 09	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
129	Lingüiça de frango – 10	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
130	Lingüiça de frango – 17	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
131	Lingüiça de frango – 18	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
132	Lingüiça de frango – 19	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
133	Lingüiça de frango – 20	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
134	Coração de frango – 01	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
135	Coração de frango – 03	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
136	Coração de frango – 04	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
137	Coração de frango – 08	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
138	Coração de frango – 09	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
139	Coração de frango – 10	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
140	Coração de frango – 11	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
141	Coração de frango – 12	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
142	Coração de frango – 13	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
143	Coração de frango – 16	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
144	Coração de frango – 24	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
145	Coração de frango – 26	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
146	Coração de frango – 27	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
147	Coração de frango – 28	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
148	Coração de frango – 29	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
149	Coração de frango – 30	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
150	Coração de frango – 31	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo **RD=** Resultado duvidoso **NR=** Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
151	Coração de frango – 32	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
152	Carne bovina resfriada	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
153	Miúdos resfriados – aves	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
154	Jiló	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
155	Jiló	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
156	Jiló	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR	NR
157	Frango resfriado – 02	POS	POS	POS	NEG	NR	POS	NEG	NEG
158	Frango resfriado – 03	POS	POS	POS	NEG	NR	POS	NEG	NEG
159	Frango resfriado – 04	POS	POS	NEG	NEG	NR	POS	NEG	NEG
160	Frango resfriado – 05	POS	POS	NEG	NEG	NR	POS	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
161	Ração – amostra 01	NEG	NEG	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NEG
162	Ração – amostra 03	POS	POS	NR	POS	POS	POS	NR	POS
163	Ração – amostra 06	NEG	POS	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NR
164	Lingüiça frescal	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
165	Lingüiça frescal	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
166	Lingüiça frescal	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
167	Carcaça de frango – 01	NEG	NEG	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NEG
168	Farelo de soja – 01	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
169	Farelo de soja – 02	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
170	Farelo de soja – 03	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							1-2 Test
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	
171	Farelo de soja – 04	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
172	Farelo de soja – 05	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
173	Farelo de soja – 06	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
174	Farelo de soja – 07	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
175	Clara de ovo pasteurizada	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
176	Carne mecanicamente separada	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
177	Carne mecanicamente separada	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
178	Lingüiça frescal – 01	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS
179	Lingüiça frescal – 02	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
180	Lingüiça frescal – 03	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	RD	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos						
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path 1-2 Test
181	Ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
182	Ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
183	Ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
184	Ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
185	Ovo em pó	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
186	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
187	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
188	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
189	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR
190	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
191	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
192	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
193	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
194	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
195	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
196	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
197	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
198	Farelo soja	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
199	Farinha de peixe	NEG	NEG	NEG	NR	NR	NR	NR	NR
200	Berinjela	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
201	Berinjela	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
202	Peru	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
203	Peru	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
204	Varredura	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
205	Varredura	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
206	Farelo de soja	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
207	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
208	Farelo de soja	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
209	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS
210	Farelo de soja	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
AMOSTRAS		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
211	Farelo de soja	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
212	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
213	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
214	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
215	Farelo de soja	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
216	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
217	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
218	Farelo de soja	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
219	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
220	Carcaça de frango	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos							
	AMOSTRAS	ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	1-2 Test
221	Carcaça de frango	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS
222	Ração	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
223	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
224	Rúcula	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
225	Peru	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
226	Lingüiça toscana	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
227	Farelo de soja	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
228	Farelo de soja moído	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
229	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
230	Farelo final de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

AMOSTRAS		Métodos							1-2 Test
		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path	
231	Farelo de soja peletizado	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
232	Farelo de soja	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
233	Farelo de soja moído	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
234	Farinha de sangue	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
235	Lombo suíno refrigerado	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
236	Carne moída (acém)	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS
237	Lingüiça toscana	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
238	Carne moída (acém)	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
239	Lingüiça toscana	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
240	Cortes congelados de frango	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

NEG= Resultado negativo

POS= Resultado presuntivo positivo

RD= Resultado duvidoso

NR= Análise não realizada

Continua

Continuação (ANEXO 1)

		Métodos						
AMOSTRAS		ISO 6579	BAX	Unique	VIP	Transia	VIDAS	Single-path 1-2 Test
241	Carne sem osso resfriada de suíno	POS	POS	NR	POS	NEG	POS	POS
242	Lingüiça mista	NEG	NEG	NR	NEG	NEG	NEG	NEG
243	Peru	NEG	NEG	NR	NEG	NEG	NEG	NEG
244	Ovo líquido	POS	POS	NR	POS	POS	POS	NEG

NEG= Resultado negativo **POS=** Resultado presuntivo positivo RD= Resultado duvidoso NR= Análise não realizada

ANEXO 2 – Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

BAX Salmonella

BAX® System with Automated Detection - Ready Reference

Enrich/regrow samples.
(See *User Guide*)

1. Create rack file with data on each sample.

2. Warm up cycler/detector.

3. Add protease to lysis buffer.

4. Add lysis reagent to lysis tubes.

5. Transfer enriched/regrown samples.

6. Heat lysis tubes (first stage),

37°C for 20 minutes
Salmonella
E. coli O157:H7
E. sakazakii

55°C for 60 minutes
Genus *Listeria*
L. monocytogenes

7. Heat lysis tubes (second stage).

95°C for full
10 minutes

8. Cool lysis tubes in cooling block.

9. Arrange PCR tubes in cooling block.

10. Transfer lysate to PCR tubes.

11. Place tubes in cycler/detector and run program.

12. Review results on screen.

ANEXO 3 – Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:
Tecra Unique Salmonella

INSTRUCTIONS

TECRA[®] unique[™]

SALMONELLA

20 tests
40 tests

FOR THE DETECTION OF *SALMONELLA SPP.*
IN FOOD AND FOOD-RELATED SAMPLES
IN LESS THAN 22 HOURS

Validation AFNOR (validated against NF EN ISO 6579 [2002])
AOAC Official Method 2000.07

For *in vitro* diagnostic use only

These instructions must
be carefully followed;
failure to do so may lead
to inaccurate results.

New Version - November 2005
Instructions Revised:
Most Sections

TABLE OF CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION	1
2. APPROVALS	1
3. MATERIALS REQUIRED	2
4. GENERAL INSTRUCTIONS	3
5. ENRICHMENT METHODS	3
6. MEDIA	5
7. PERFORMING THE TEST MANUALLY	7
8. READING THE RESULT MANUALLY	11
9. PERFORMING THE TEST USING UNIQUE PLUS [™]	11
10. FOLLOW-UP ACTIONS	13
11. BIBLIOGRAPHY	15
12. TROUBLE-SHOOTING GUIDE	17

Continua

1. INTRODUCTION

The TECRA® UNIQUE™ SALMONELLA test replaces traditional methods of Salmonella screening, and provides the user with all necessary reagents in a single-test module. Following enrichment of the test sample, the UNIQUE stick performs both the immunoenrichment and detection steps.

It is designed to provide convenient and rapid detection of motile and non-motile Salmonella (including *S. pullorum* and *S. gallinarum*) in food and food-related samples, including animal feed and environmental samples.

The limit of sensitivity is defined as the lowest concentration point where reliable analytical results can be obtained. This may vary with different serotypes. For UNIQUE Salmonella this has been demonstrated to be 1-5 cells/25g of sample, equal to 10⁴-10⁶ Salmonellae/mL after enrichment.

Presumptive positive results can be obtained in less than 22 hours and should be confirmed by standard methods¹. This is especially important in situations such as product recalls.

For additional information on the use of the UNIQUE stick, refer to the TECRA UNIQUE PLUS manual.

2. APPROVALS

The UNIQUE method has been evaluated in extensive trials using a wide variety of food products. UNIQUE has been found to be at least as sensitive as standard culture techniques.^{2,3,4,5}

AOAC Official Methods First Action Status

First Action Status has been granted by the AOAC Official Methods Board for AOAC Official Method 2000.07 Salmonella in Foods, TECRA UNIQUE Test, for all foods, including orange juice with module incubation at 42°C and excepting raw flesh foods.

AFNOR Status

The AFNOR Methods Board has assessed and approved the method against ISO standard NF EN ISO 6579 (2002), Approval TEC - 24/3 - 12/03.

1

3. MATERIALS REQUIRED

3.1 Materials supplied in the Kit

Each pack contains:

- UNIQUE Modules: 20 Modules (SALUNQ20) or 40 Modules (SALUNQ40)
- Antibody-coated sticks: 20 (SALUNQ20) or 40 (SALUNQ40)
- Instruction Book
- Color Card

3.2 Materials Required for Sample Enrichment

Refer to Table 1 for the materials specific to the food being tested.

- Media (Section 6)
- Blender or homogeniser
- 0.45µm cellulose acetate filters for the filtration of water samples
- Plastic sample bags or Filter sample bags
- Incubator: 35-37°C or 41-43°C

3.3 Materials Required to Run the Test

- Pipette capable of dispensing 1mL
- Incubator: 35-37°C or 41-43°C

or
TECRA UNIQUE PLUS for automated testing

3.4 Materials Available through TECRA

Product Code	Description	Size
SALUNQ20	TECRA UNIQUE Salmonella	20 tests
SALUNQ40	TECRA UNIQUE Salmonella	40 tests
QE-MBPW-225	Quick-Enrich™ MBPW	225mL/pouch
MBPMED500	TECRA Modified Buffered Peptone Water	500g
MBPMED2000	TECRA Modified Buffered Peptone Water	2000g
BPWMED500	TECRA Buffered Peptone Water	500g
BPWMED2000	TECRA Buffered Peptone Water	2000g
MLBMED500	TECRA Modified Letheen Broth	500g
SALSUP250	TECRA Salmonella Supplement	250mL
SALSUP500	TECRA Salmonella Supplement	500mL
IMBSUP50	Imbentin Supplement	50mL
IMBSUP1000	Imbentin Supplement	1 litre
IMBSUP2000	Imbentin Supplement	2 litre
ENVSWB25	TECRA ENVIROSWABS	25 swabs
ENVSWB500	TECRA ENVIROSWABS	500 swabs
FSTBAG100	Filter sample bags	100 bags
MEATPK20	Raw Meat Pack	
	- Filter sample bags	20 bags
	- Imbentin	50mL
UNQPLUS01	TECRA UNIQUE PLUS	1 unit
UNQTAPEG1	Sealing Tape - Green	1 roll
UNQTRAY10	UNIQUE Support Tray	10 trays
UNQREDM10	Red Modules	10 units
UNQCAL01	UNIQUE PLUS Calibration Assembly	1 unit
UNQLINK01	TECRA PLUSLINK™ software	1 CD
GNID10	Gram Negative ID system	10 tests

We also recommend the use of BioPro® dehydrated culture media, available from Biotrace International.

TECRA products are available directly from TECRA or Biotrace, or through a worldwide network of distributors. For information or technical assistance contact TECRA, Biotrace or your local TECRA product Distributor during normal working hours. For Distributor contact details or emergency inquiries, contact TECRA directly. Refer to the last page of this book for details.

2

4. GENERAL INSTRUCTIONS

The **C** symbol indicates points of critical importance.

- Keep kit refrigerated (2-8°C) when not in use. **DO NOT FREEZE.**
- The kit must be used **before** the Use-by Date on the outside label of the box.
- Modules and antibody-coated sticks carrying the same batch number are matched and should **NOT** be used with tests of a different batch number.
- The antibody-coated stick should be used as soon as it is removed from the foil pouch.
- UNIQUE Sealing Tape is non inhibitory to Salmonella and is required to seal UNIQUE modules.
- Do not autoclave the UNIQUE Support Tray.

Ensure all components are at room temperature (20-25°C) before use.

5. ENRICHMENT METHODS

C CAUTION: It is possible that viable, pathogenic organisms will be present when testing contaminated samples. Appropriate laboratory safety practices for handling potentially pathogenic organisms must be followed throughout.

Enrichment broths must be prewarmed to 20-25°C (room temperature) before combining with samples. When using volumes greater than 225mL, enrichment broths should be prewarmed to 35-37°C before addition of samples.

To ensure thorough mixing of sample in the medium, homogenise or blend as appropriate.

5.1 Food Samples

Aseptically combine the enrichment broth and the sample, thoroughly mix and incubate as outlined in Table 1.

5.2 Water Samples

Add 0.5g/L Sodium thiosulphate to water sample if chlorine is present

Filter through 0.45µm cellulose acetate filter

Add filter to 100mL MBPW
Incubate 35-37°C for 16-20 hours

5.3 Environmental Swabs

Swab surface with TECRA ENVIROSWAB™ and return swab into tube

Add 20mL MBPW and mix well

Incubate 35-37°C for 16-20 hours

Note: Laboratories using swabs other than the TECRA ENVIROSWAB™ should validate the use of appropriate media for their type of samples.

3

Table 1: Enrichment Protocols

Food	Sample Size	Enrichment Broth	Temp. (°C)	Time (hours)
Most Foods	25g	225mL MBPW	35-37	16-20
Raw Meats#	25g	MBPW + 11.25mL TECRA Salmonella Supplement + 2.25mL Imbentini to make 225mL in Filter sample bag	41-43	16-20
Raw egg (whole egg, egg yolk or egg white)	25g	MBPW + 11.25mL TECRA Salmonella Supplement + 2.25mL Imbentini to make 225mL	41-43	16-20
Cocoa & Chocolate Products	25g	225mL Buffered Skim Milk	35-37 homogenise for 2 min then 35-37	2 16-20
Most Marine and Fresh water foods	25g	225mL MBPW	35-37 or 41-43	16-20
Fish & Fish Products (incl. smoked fish)	25g	MBPW + 2.25mL Imbentini to make 225mL in Filter sample bag	35-37 or 41-43	16-20
Smoked Mussels (canned or fresh)	25g	475mL MBPW	35-37 or 41-43	16-20

excluded from AOAC evaluation 2000.07.

Food	Sample Size	Enrichment Broth	Temp. (°C)	Time (hours)
Garden Vegetable Salads	25g	MBPW + 11.25mL TECRA Salmonella Supplement to make 225mL	41-43	16-20
Active Dried Yeast	25g	225mL MBPW + Malachite Green oxalate*	35-37	16-20
Coconut	25g	MBPW + 2.25mL Imbentini to make 225mL	35-37	16-20
Onion Flakes Onion Powder Garlic Flakes	25g	225mL MBPW + Potassium sulfite (K ₂ SO ₃)**	35-37	16-20
Allspice Cinnamon Oregano	2.5g	247.5mL MBPW	35-37	16-20
Cloves	2.5g	2,497.5mL MBPW	35-37	16-20
Animal Feeds	25g	MBPW*** + 11.25mL TECRA Salmonella Supplement + 2.25mL Imbentini to make 225mL in Filter sample bag	41-43	16-20

* Final concentration of 0.1% prior to sterilisation (1g in 1L)

** Final concentration of 0.5% prior to sterilisation

*** If the Animal Feed is known to contain antimicrobial compounds, substitute Modified Lethen Broth (MLB) for MBPW.

4

7. PERFORMING THE TEST MANUALLY

- 7.1 Ensure sticks and modules are at room temperature (20-25°C).
- 7.2 Label modules. Place modules into UNIQUE Support Tray and keep them in the tray throughout the test.
- 7.3 Mix the enrichment broth.

- 7.4 Remove foil from Tubes 1 to 3.

- 7.5 Add 1mL of enrichment broth to Tube 1.

- 7.6 Open the required number of foil pouches and remove sticks. Avoid touching the antibody-coated area.

- 7.7 Place stick into Tube 1 with the numbered side towards Tube 2.

Mix by moving the stick UP and DOWN TWICE.

C The stick must come all the way out of the liquid, but NOT out of the tube itself, then go all the way back in.

- 7.8 Put the tray with the modules into the incubator as per Table 2 (Tube 1).

7

Table 2: Module Incubation Conditions

Food	Tube 1	Tube 3	Tube 4
Most Foods) Raw Meats) Raw Egg) Salads) Active Dried Yeast) Coconut) Onion Flakes) Onion Powder) Garlic Flakes) Allspice) Cinnamon) Oregano) Cloves) Animal Feeds) Water) Environmentals)	35-37°C for 20-40 minutes	35-37°C for 4-5 hours	35-37°C for 30-40 minutes
Fruit Juice) Marine and Fresh Water) foods including: • Smoked Mussels) (canned or fresh) • Fish & Fish Products) (incl. smoked fish))	35-37°C or 41-43°C for 20-40 minutes	35-37°C or 41-43°C for 4-5 hours	35-37°C or 41-43°C for 30-40 minutes
Chocolate or samples containing cocoa	41-43°C for 20-40 minutes	41-43°C for 5-5.5 hours	41-43°C for 30-40 minutes

8

Continuação (ANEXO 3)

- 7.9 Transfer the stick into Tube 2.
Wash by moving the stick UP and DOWN FOUR times.

- 7.10 Transfer the stick into Tube 3.

- 7.11 Return the tray with the modules into the incubator as per Table 2 (Tube 3).

- 7.12 Remove the foil from Tubes 4 to 6.

- 7.13 Transfer the stick into Tube 4.
Cover Tubes 1 to 3 with UNIQUE Sealing Tape.

(Only use TECRA's non inhibitory UNIQUE Sealing Tape.)

- 7.14 Return the tray with the modules into the incubator as per Table 2 (Tube 4).

9

- 7.15 Transfer the stick into Tube 5.
Wash by moving the stick UP and DOWN FIVE times.

- 7.16 Transfer the stick into Tube 6.

- 7.17 Incubate module at 20-25°C (room temperature) for at least 10 minutes and not more than 15 minutes.

- 7.18 Place the stick into the end position to view the color spots. Refer to the color card.

Read the result within one hour (see Section 8).

- 7.19 If the modules are to be stored or used to confirm results, snap off the top part of the stick and seal the module with UNIQUE sealing tape. The modules can then be removed from the tray and stored refrigerated (2-8°C) for future use. The appearance of the sticks may change over time even when refrigerated.

CAUTION: Any positive sticks will carry live *Salmonella*. Therefore standard laboratory safety practices should be followed.

10

Continua

8. READING THE RESULT MANUALLY

The test incorporates a positive control and a negative control, and the test result.

The Positive Control is located on the stick between positions 1 & 2. A valid test will have color (grey to purple shading) in this region (refer to the Color Card).

Any shading or color in this region indicates that the PC is present and the test has worked. Its absence indicates a step may have been omitted, and the result cannot be used. Consult the Trouble-shooting Guide before repeating the test.

The negative control is located on the stick between positions 2 & 3. A valid test will have no color (white) in this region.

The test result is located on the stick between positions 3 & 4. A positive result will have any color (grey to purple shading) in this region. A negative result will have no color (white) in this region.

The result should be read within one hour after the color development step.

9. PERFORMING THE TEST USING UNIQUE PLUS™

Refer to the UNIQUE PLUS Operator's Manual (provided with the UNIQUE PLUS instrument) for detailed instructions on operation of the instrument.

- 9.1 Press the "Power" button to activate the UNIQUE PLUS instrument.

- 9.2 Put the appropriate Protocard™ into the UNIQUE PLUS card slot with the TECRA logo facing towards the keyboard. Refer to Table 3 for choice of card.

Check version number of Protocard. It is important that the correct version is used.

Table 3 Protocard Applications

Food	Protocard	Version No.	Duration (approx.)
Most foods including seafood, fruit juice, environmental and water samples	Salmonella A	1.03	5 hours @ 37°C
Fruit juice (optional)	Salmonella B	1.03	5 hours @ 42°C
Marine and Fresh water foods (optional)	Salmonella C	1.03	6 hours @ 42°C
Chocolate or samples containing cocoa	Salmonella C	1.03	6 hours @ 42°C

- 9.3 Ensure sticks and modules are at room temperature (20-25°C). Label modules.

- 9.4 Enter sample data and other relevant information into UNIQUE PLUS (refer to Operators Manual) and place the modules into positions in the tray as shown on the screen. If the tray is not full place a Red Module adjacent to each end module.

Always remove the tray from UNIQUE PLUS and place on a bench before adjusting modules or sticks.

- 9.5 Remove foil from Tubes 1 to 3 and Tubes 4 to 6 of all modules.

- 9.6 Mix enrichment broths.

- 9.7 Transfer 1mL of the enrichment broth to Tube 1.

- 9.8 Open the required number of foil pouches and remove sticks. Avoid touching the antibody-coated area.

- 9.9 Place the stick into the launch position of the module (NOT Tube 1) with the numbered side towards Tube 1.

- 9.10 Open door by pressing "Door" button.

- 9.11 Place the tray into UNIQUE PLUS and close door.

- 9.12 Start the test run.

13

Incubate plates at 35-37°C for 24 hours then examine for suspect *Salmonella* colonies. If BSA is used it should be reincubated and examined again at 48 hours.

Pick off suspect colonies and restreak onto Tryptone Soya Agar (TSA). Incubate at 35-37°C for 24 hours. Select a pure colony and perform standard biochemical confirmation tests. Check for agglutination with Polyvalent O and Polyvalent H antisera¹.

An alternative confirmation method for highly contaminated samples (raw flesh foods, animal feeds, environmental etc.) is as follows:

Transfer 100µL of the broth in Tube 3 into 9.9mL of Rappaport Vassiliadis (RV) broth. Incubate at 41-43°C overnight. Streak onto standard selective media and perform the standard biochemical and serological tests as described above¹.

- 9.13 A results summary will be automatically printed out at the end of the test run or can be downloaded onto a computer using the TECRA PLUSLINK™ software.

- 9.14 At the end of the test run, open the door, take tray out of instrument and close the door. If the modules are to be stored or used to confirm results, snap off the top part of the stick and seal the module with UNIQUE sealing tape. The modules can then be removed from the tray and stored refrigerated (2-8°C) for future use. The appearance of the sticks may change over time even when stored refrigerated.

10. FOLLOW-UP ACTIONS

10.1 Confirming Positive Samples

Presumptive positives should be confirmed from the broth in Tube 3 by streaking onto standard selective media. It is recommended that at least two of the following selective agars are used:

Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD)
Hektoen Enteric Agar (HEK)
Bismuth Sulfite Agar (BSA)

10.2 Identification

The TECRA® Gram Negative Biochemical ID Test System can be used to confirm the identity of Enterobacteriaceae and other non-fastidious, oxidase negative, Gram negative bacilli, such as *Salmonella* spp., isolated from food and environmental sources.

Refer to section 3.4 for ordering details.

10.3 Disposal

Autoclave modules and sticks at 121°C for at least 30 minutes. Then empty module contents and recycle or dispose of in accordance with local regulatory requirements.

The UNIQUE Support Tray and Red Modules (UNIQUE PLUS users only) are reusable and should not be autoclaved. If necessary they can be wiped clean with 70% ethanol or a similar disinfectant, washed and dried.

11. BIBLIOGRAPHY

1. Andrews, W.H. and Hammack, T.S. (2003) in U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. 8th edition. Chapter 5 - Salmonella. Available at <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>
2. Kerr, D., Ash, M. and Chee, D. (1993) "Evaluation of a twenty-two hour modular stick system for the visual detection of Salmonella" AOAC Abstracts.
3. Jones, K.L., Macphee, S., Turner, A. and Betts, R.P. (1995) "An Evaluation of the **TECRA** UNIQUE Salmonella Test for the Detection of Salmonella from Foods" Campden & Chorleywood Food Research Association - R&D Report No. 5, Project No. 18410.
4. Hughes, D., Dailianis, A.E., Hill, L., McIntyre, D.A. and Anderson, A. (2001) "**TECRA**® **UNIQUE**™ Test for Rapid Detection of Salmonella in Food: Collaborative Study" Journal of the AOAC International **84**(2): 416-429.
5. Dawson, D.J. (2001) "EMMAS Assessment of the **TECRA**® **UNIQUE** Salmonella Assay" European Microbiological Methods Assessment Scheme.

Summary of UNIQUE Procedure

12. TROUBLE-SHOOTING GUIDE

Problem	Probable Cause	Action
Positive Control not visible	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stick not incubated in Tube 4 or Tube 6 2. Sticks or modules stored at elevated temperature or below freezing prior to use 3. Use-by date exceeded 	<p>Repeat test</p> <p>Sticks or modules must be stored at 2 - 8°C prior to use</p> <p>Check Use-by date</p>
Entire stick purple or blotchy	<ol style="list-style-type: none"> 1. Food particles adhering to the stick after capture 2. Wash Step not performed correctly 	<p>Repeat test using filter sample bags</p> <p>Ensure stick is washed FOUR times at Tube 2 and FIVE times at Tube 5</p>
Negative control spot purple, sample spot white	Non-specific binding in the negative control region by food or microbial action	If the PC is visible, then the test result is negative

When investigating problems with the TECRA UNIQUE PLUS instrument, refer to Trouble-shooting guide in Operators Manual.

ANEXO 4 – Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

VIP Salmonella

VIP for Salmonella

AOAC® Official Method 999.09
One step test for the detection of motile and non-motile
Salmonella species in all foods.

BIOCONTROL

Results. Right now.

GENERAL DESCRIPTION

VIP® for *Salmonella* is a single-step visual assay that detects motile and non-motile *Salmonella* species. Each VIP test is self-contained and can be performed individually or in groups. A proprietary reagent system, which forms an antigen-antibody-chromogen complex if *Salmonella* is present, ensures a high level of sensitivity and specificity for *Salmonella*.

DIRECTIONS FOR USE

A. Test Portion Preparation and Enrichment

(a) Pre-Enrichment

Low Microbial Foods Add 25 g test portion to 225 mL of prewarmed appropriate pre-enrichment broth (see Appendices I & II) and incubate 6-8 h at 35-37°C.

Dried Powder Processed Foods Add 25 g test portion to 225 mL of prewarmed BHI broth + 1 mL enrichment supplement containing Oxyrase® (BHI+O) (see Appendix III) and incubate 6-8 h at 35-37°C.

High Microbial Foods Add 25 g test portion to 225 mL of Buffered Peptone Water + novobiocin (see Appendix IV) and incubate 18-26 h at 35-37°C.

(b) Selective Enrichment

Low Microbial Foods Transfer 25 mL pre-enrichment broth to 5 mL of 5X concentrate Rappaport-Vassiliadis (RV) broth in a 25 x 150 mm test tube and transfer another 25 mL broth to 5 mL of 5X concentrate Tetrathionate (TT) broth. Incubate 16-24 h in a 42°C water bath.

Dried Powder Processed Foods Transfer 25 mL BHI+O to 5 mL of 5X TT broth. Incubate 16-24 h in a 42°C water bath.

High Microbial Foods Transfer 0.1 mL pre-enrichment broth to one 10 mL tube of RV broth and transfer another 1.0 mL to one 10 mL tube of TT broth. Incubate 16-24 h in a 42°C water bath.

(c) Post-Enrichment

Low Microbial Foods Following selective enrichment incubation, transfer and combine 0.5 mL of each paired TT and RV broths into a single tube of 10 mL prewarmed Trypticase Soy Broth with dinitrophenol and novobiocin (TSB+DNP+n). Label tubes. Incubate 6-8 h at 35-37°C.

Dried Powder Processed Foods Transfer 1 mL TT into prewarmed 10 mL TSB+DNP+n. Incubate 6-8 h at 35-37°C.

High Microbial Foods Transfer and combine 0.5 mL of each paired TT and RV broths into a single tube of 10 mL prewarmed TSB+DNP+n. Label tubes. Incubate for 5-8 h in a 42°C water bath.

NOTE: Retain original TSB+DNP+n broth tubes under refrigeration (2-8°C). Use for confirmation of presumptive positive results (see section D).

B. Sample Inactivation

Prewarm extraction reagents by placing bottles in hot water for 10 min. Swirl each bottle gently to thoroughly mix. Add 0.1 mL Extraction Reagent 1 and 0.1 mL Extraction Reagent 2 to empty tube. Vortex mix incubated TSB+DNP+n tube and transfer 1.0 mL to tube with extraction reagents. Vortex thoroughly. Inactivate microorganisms at 121°C for 10 min. Cool tubes to 25-37°C before testing. Tubes that have been autoclaved can be stored for up to 4 days prior to testing at 2-8°C.

C. Sample Analysis

(a) Open the sealed pouch containing VIP units and remove the required number of tests. One device is necessary for each test portion. VIP units may not be reused. Reseal unused VIP units in pouch containing desiccant. Store at ambient temperature in a cool dark location.

(b) Enriched broths should be equilibrated to 25-37°C prior to running the test.

(c) Vortex contents. Transfer 0.1 mL of inactivated TSB+DNP+n broth from to sample addition well. Transfer only the liquid, not the food particulates to the device.

(d) Incubate at ambient temperature for 10 min.

D. Reading and Interpreting Results

NOTE: Examine test unit at 10 min. Beyond this time faint lines may develop because of non-specific color development and should be disregarded.

(a) Examine VIP unit for the presence of distinct detection lines in both test sample and test verification windows. Lines should be dark when contrasted with white background and should extend across window. Intensity of test sample and test verification lines may differ. Absence of a control line indicates an invalid test result. Contact BioControl Technical Services at 1-800-245-0113.

(b) Test sample is considered positive when lines are present in the test sample window and in the test verification window.

(c) Test sample is considered negative when a line is present in the test verification window and no line is seen in test sample window. If no line is present in test verification window, test is invalid.

(d) Positive and negative control cultures should be run to familiarize the analyst with results interpretation.

(e) Autoclave used units at 121°C for 15 min prior to discarding.

E. Confirmation

Presumptive positive samples must be confirmed using culture methods as described in current edition of U.S. Food and Drug Administration *Bacteriological Analytical Manual*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD 20877, or USDA methods. Isolate from retained refrigerated TSB+DNP+n broth tubes.

F. Storage

Completely reseal unused VIP units in pouch with desiccant pack. The moisture indicator line on the desiccant pack must be blue. Store at room temperature, 15-25°C (59-77°F).

Do not refrigerate.

Contact Biocontrol Technical Services For Assistance
In *Salmonella* Confirmation Procedure

ANEXO 5 – Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

Transia Plate Salmonella Gold

TRANSIA[®] PLATE Salmonella Gold

RAISIO

DIAGNOSTICS

SA0180 – Kit validated by AFNOR - ref. TRA 02/8 - 03/01

Package Insert

Intended use

TRANSIA[®] PLATE Salmonella Gold is an ELISA kit intended to be used by food microbiologists for the in vitro determination of *Salmonella* genus. The assay reliably recovers and detects low levels of *Salmonella* in a variety of foods and feeds.

TRANSIA PLATE Salmonella Gold has been validated by both AFNOR and NordVal for foods, feeds and environmental samples.

TRANSIA PLATE Salmonella Gold has been validated by the AOAC Research Institute under the Performance Methods Tested Program for the following tested matrices (raw ground turkey, Brie cheese, cooked chicken, raw milk, cantaloupe, sausages, raw shrimps, yogurt, mayonnaise, shell eggs, frozen red berries & currants, bean sprouts, raw ground beef, smoked trout, fresh pasta, milk chocolate, ground black pepper, cake mix, dry milk-based infant formula and dry food for cat).

Assay principle

The enrichment procedure comprises two stages, buffered peptone water (BPW) as a pre-enrichment medium, followed by Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) as a selective enrichment medium. A protocol validated in-house using Muller-Kauffmann/Tetrathionate is available on request.

TRANSIA PLATE Salmonella Gold is based on a three-step, sandwich-type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). The solid support of the reaction is a microtitre plate with divisible strips coated with antibodies specific for *Salmonella*.

Materials

Kit components

- Microtitre plate with divisible strips, 96 wells (8 wells x 12 strips) – 1 pc
- Lid for the microtitre plate – 1 pc
- Vial 1: negative control – ready to use – 1 x 6 mL
- Vial 2: positive control: LPS (lipopolysaccharide) – ready to use – 1 x 3 mL

- Vial 3: washing buffer – concentrated 20X – 1 x 60 mL
- Vial 4: conjugate: anti-*Salmonella* antibodies conjugated to peroxidase – ready to use – 1 x 15 mL
- Vial 5: substrate: Urea-H₂O₂ – 1 x 10 mL
- Vial 6: chromogen: TMB – 1 x 10 mL
- Vial 7: stop solution: H₂SO₄ – ready to use – 1 x 15 mL

Equipment required but not provided

For sample and reagent preparation:

- Scales and weighing vessels
- Homogeniser according to ISO 7218 (i.e. stomacher)
- Stomacher bags, preferably with a filter or Erlenmeyer flasks (500 mL)
- Tubes (20 mL) for the subcultures
- Magnetic stirrer
- Air incubator at 37°C ± 1°C
- Air incubator at 41.5°C ± 1°C or **preferably** a water bath with circulating water at 41.5°C ± 0.5°C.
- Vortex
- Screw tubes (5 or 10 mL) resistant to 100°C
- Tubes 1L, beaker 1L
- Water bath 95-100°C (boiling water)

For the immunoenzymatic test:

- Micropipette 100-1000 µL
- Micropipette 10-100 µL (optional)
- Wash bottle or **preferably** an automatic microplate washer
- Absorbent paper
- Multipipette with 2.5 and 5 mL combitips
- Microtitre plate reader - single or double beam reading 450 nm filter and reference filter ≥ 595 nm.

Continua

For confirmation of samples:

- Air incubator at 37°C ± 1°C

Material required but not provided

For sample preparation

- Distilled water
- Buffered peptone water
- Rappaport-Vassiliadis soya. Merck 1.07700, Biokar BK148, Bio-Rad 356 4324, Oxoid CM866, Oxoid CM669 and Lab-M LAB 86 are recommended. **Note:** Because of a high magnesium chloride content, Oxoid CM669 is not recommended in the Nordic countries.

For confirmation of samples:

- Selective agar plates such as xylose lysine deoxycholate, bismuth sulfite or brilliant green agar.
- Biochemical identification gallery

Storage conditions

The kit components should be stored at 2-8°C. The kit expiry date (3 to 12 months from delivery) is shown on the box label.

Safety

Good laboratory practice should be employed when using this kit. Safety clothing should be worn and skin contact with reagents avoided. Do not ingest.

Material and safety data sheets are available on request.

Contaminated material should be disposed according to local, state and federal regulations.

Test procedure

Preparation of reagents

- **Important:** allow the reagents to come to room temperature (18-30°C). Remove them from the box at least one hour before use.
- Have all the reagents and samples ready for use so that the various materials can be added to the wells without delay.
- Shake each vial manually or with a vortex before use.

- Do not interchange reagents between kits with different batch numbers.

Preparation of the buffered peptone water, Rappaport-Vassiliadis soya enrichment broth and plating media

Follow the manufacturer's instructions.

Dilution of washing buffer 20X

The dilution could be done in advance or during the first incubation step. See assay procedure, step 3.

1. Dilute the washing buffer 20X (vial 3) in distilled water 1/20 – 60 mL washing buffer 20X and 1140 mL of distilled water.
2. Mix and fill the washing device.
3. Store the washing buffer 1X at 2-8°C for a maximum of three months.

Mixing of chromogen and substrate

The mixture of chromogen and substrate cannot be prepared more than two hours in advance due to the potential loss of activity. This is done during the second incubation of the assay. See Assay procedure, step 6.

- Mix 60 µL of the substrate (vial 5) and 60 µL of the chromogen (vial 6) for each well used.

Preparation of samples

1. Homogenise X grams or X mL of the sample with 9X mL of buffered peptone water in a stomacher bag or Erlenmeyer flask, following the special requirements of EN ISO 6579:2002 standard. **Note:** Samples exceeding 25 grams are not included in the scope of the AFNOR validation.
2. Incubate at 37°C ± 1°C for 16-20 hours.
3. Homogenise and inoculate 0.1 mL of the pre-culture broth in 10 mL of RVS.
4. Incubate for 18-24 hours at 41.5°C ± 1°C in an air incubator, or **preferably** at 41.5°C ± 0.5°C in a waterbath with circulating water.
5. Heat 1-2 mL of the enrichment broth in a tube in a water bath at 95-100°C (boiling water) for 20 minutes, then **cool to room temperature**. Keep the rest of the tube with the enrichment broth available if confirmation of a positive or doubtful result is necessary.

Storage of samples

- If the test cannot be performed immediately after the RVS broth incubation time (18-24 hours), incubated broth can be stored up to 48 hours at $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ before heat inactivation and ELISA test (this does not apply to the AOAC RI validation as the additional storage was not included in the study).
- Do not store the incubated RVS medium more than 2 days at $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ before performing the confirmation of positive or doubtful results.

Sample preparation flow chart

A protocol validated in-house using Muller-Kauffmann/Tetrathionate is available on request.

Performance characteristics

Detection limit

The assay allows the detection of $10^5 - 10^6$ cells per mL in the selective enrichment broth. The study performed in 2004 for AFNOR and NordVal approvals showed that the detection level of the method was between 0.3 and 1.4 cells/25 grams of sample.

Specificity

No false positive samples were found in the AFNOR or NordVal validation studies.

Specificity study performed for AOAC Research Institute showed that this test might miss *Salmonella* serovars from Groups X and Y.

Special application

This kit has been validated in-house for TRANSIA Elisamatic and TRANSIA 4U, and the results obtained are equivalent to the results obtained using the manual procedure. The protocols are available on request. For further instructions on how to use the kit in the automatic system, see the relevant User's Manual.

A specific enrichment protocol (TAG 24 Salmonella method) has been certified by AFNOR for the detection of *Salmonella* spp., in 24 hours only, with TRANSIA PLATE Salmonella Gold. This certification applies to all foods and feeds. See the specific Package Insert of TRANSIA ADDITIVE Salmonella Gold 24h (NOT COM 1801).

Appendices

Work sheet - Immunoassay results ENR COM 511.

Validations

AFNOR: Foods, feeds and environmental samples. Validation certificate TRA 02/8-03/01. Reference method EN ISO 6579:2002. Validation performed according to the EN ISO 16140 standard.

NordVal: Foods, feeds and environmental samples. NordVal reference: 001. Reference method EN ISO 6579:2002.

AOAC-RI: Producer supplied samples of this test kit model were independently evaluated by the AOAC Research Institute and were found to perform to the producer's specifications as stated in the test kit's descriptive insert. The producer certifies this kit conforms in all respects to the specifications originally evaluated by the AOAC Research Institute as detailed in the Performance Tested MethodsSM. Certificate number 010602. Reference method EN ISO 6579:2002.

- The AOAC-RI study showed the high levels of inclusivity (96.1%) and exclusivity (100%) of the assay. The overall method agreement calculated on confirmed results between TRANSIA™ PLATE Salmonella Gold and the ISO 6579:2002 methods was 98.8%.

With a sensitivity rate of 99.3 % and a specificity rate of 97.4 % the Transia Plate Salmonella Gold method appeared to give comparable results to

the reference method for the 20 tested matrices (for details on the 20 matrices, see Intended use, page 1).

Result interpretation

Validation of the test

- The optical density of the positive control, OD (PC) must be equal to or higher than 0.700.
- The optical density of the negative control, OD (NC) must be equal to or lower than 0.150 (for double beam reading) or 0.200 (for single beam reading).
- If the controls do not meet these requirements, the results are invalid.

Positive threshold

Calculate the positive threshold as the average of the negative controls plus 0.11:

$$\text{Positive threshold} = \frac{\text{OD}(\text{NC1}) + \text{OD}(\text{NC2})}{2} + 0.11$$

Negative threshold

Calculate the negative threshold as the positive threshold multiplied by 0.9.

Negative samples

The sample is considered negative for *Salmonella* if its optical density is lower than the negative threshold.

Doubtful samples

The sample is considered as doubtful if its optical density is lower than the positive threshold but equal to or higher than the negative threshold.

This result has to be confirmed by streaking onto selective media plates followed by a biochemical identification (see Confirmation of positive results).

Positive samples

The sample is considered positive for *Salmonella* if its optical density is equal to or higher than the positive threshold.

Confirmation of positive results

A positive result shall be confirmed by streaking onto selective media plates followed by a biochemical identification (see EN ISO 6579:2002).

If the positive TRANSIA PLATE Salmonella Gold result is not confirmed, those working according to the protocol approved by AFNOR are requested by AFNOR to guarantee that all possible actions have been taken in order to validate the final result. We recommend to use additional media plates utilising other biochemical features of the *Salmonella* genus. For a good reading some colonies must be clearly isolated. If not repeat the streaking.

Assay procedure

Have all the reagents and samples ready for use and at room temperature so that the various materials can be added to the wells without delay. Shake the reagent vials before use. The washing step is very important. When washing, direct a strong jet at the bottom of the well. Wipe the microtitre plate lid clean before each use.

1. Attach the required number of strips to the plate: two wells for the negative control, one for the positive control and one well for each sample. Return the unused strips to the zip-lock bag containing dehydrating agent and close it tightly. Write the position of the samples on the work sheet (ENR COM 511).

2. Distribute **100 µL** of the controls and the samples into the assigned wells. Cover the plate with the lid.

3. Incubate at **room temperature** (18-30°C) for **one hour**. Prepare the washing buffer – see Preparation of reagents.

4. Holding the plate firmly, shake out the contents of the plate by briskly flicking your wrist. Rinse each well, keep the washing buffer in the wells for one minute (for the first two washings). Empty the plate over a container and then remove the remaining liquid by inverting the plate onto a paper towel and tapping the plate firmly several times. Repeat the washing **five times**.

5. Add **100 µL** of the conjugate (vial 4) to each well. Be careful not to touch the wells with the tip. Cover the plate with the lid.

6. Incubate at **room temperature** (18-30°C) for **30 minutes**. Just before the end of this incubation stage, prepare the required volume of the substrate/chromogen mixture – see Preparation of reagents.

7. Holding the plate firmly, shake out the contents of the plate by briskly flicking your wrist. Rinse each well, keep the washing buffer in the wells for one minute (for the first two washings). Empty the plate over a container and then remove the remaining liquid by inverting the plate onto a paper towel and tapping the plate firmly several times. Repeat the washing **five times**.

8. Add **100 µL** of the substrate/chromogen mixture to each well using a multipipette and cover the plate. Discard any unused mixture.

9. Incubate at **room temperature** (18-30°C) for **15 minutes**.

10. Add **100 µL** of the stop solution (vial 7) to each well, following the same order used when the substrate was added. Mix the contents of the wells thoroughly to ensure complete colour conversion. The blue turns to yellow.

11. Read the optical densities at 450 nm using a plate reader (blank on air), use a reference filter ≥595 nm for double beam reading.

AFAQ AFNOR Certification has granted AFNOR Validation Mark to TRANSIA PLATE Salmonella Gold. Validation Scope: All human and animal food products and environmental samples (except breeding samples). Reference method EN ISO 6579:2002 Validation study performed according to the EN ISO 16140 standard.

Validation certificate TRA 02/8-03/01 valid till 2009.02.03.

TRA 02/8 – 03/01
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
Analytical performances certified
AFAQ AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

Produced and distributed by :

Raisio Diagnostics SAS
8, rue Saint Jean de Dieu - 69007 Lyon - France
Tel: +33 4 72 71 56 80 - Fax: +33 4 72 73 43 34

RAISIO

DIAGNOSTICS

www.raisiodiagnostics.com

does not offer a warranty of any kind, neither express nor implied, of the quality control standards set by the Raisio Diagnostics company. It is not liable in any way for loss of profits or any injury or damage to property, arising from the use of this product or the procedure.

Anexo 6- Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

VIDAS *Salmonella* (SLM)

REF 30 702

05984 K - en - 2006/07

VIDAS[®] *Salmonella* (SLM)

For microbiological control only

VIDAS[®] *Salmonella* is an automated qualitative test for use on the VIDAS[®] instruments, for the detection of *Salmonella* in food and environmental samples, using the (Enzyme Linked Fluorescent Assay ELFA) technique.

SUMMARY AND EXPLANATION

Salmonella is one of the main causes of food poisoning. *Salmonella* detection using time-consuming protocols, can take up to 5 days to confirm a sample is negative (1). Enzyme immunoassay (EIA)-based screening techniques have the potential to simplify and accelerate this detection.

Salmonella are antigenically complex with over 2200 serovars differentiated by somatic (O) lipopolysaccharide and flagellar (H) protein antigens (2). The VIDAS[®] *Salmonella* (SLM) automated EIA test for the detection of *Salmonella* in food and environmental samples, uses a cocktail of highly specific monoclonal capture antibodies directed against both O and H antigens which enables the detection of both motile and non-motile *Salmonella*.

PRINCIPLE

VIDAS[®] *Salmonella* is an enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella* antigens using the ELFA method (Enzyme Linked Fluorescent Assay) performed in the automated VIDAS[®] system (see the Operator's Manual). The Solid Phase Receptacle (SPR[®]) serves as the solid phase as well as the pipetting device. The interior of the SPR[®] is coated with anti-*Salmonella* antibodies adsorbed onto its surface. Reagents for the assay are ready-to-use and pre-dispensed in the sealed reagent strips.

All of the assay steps are performed automatically by the instrument. The reaction medium is cycled in and out of the SPR[®] several times.

An aliquot part of the heated enrichment broth is placed in the reagent strip. *Salmonella* antigens present will bind to the anti-*Salmonella* monoclonal antibodies coating the interior of the SPR[®]. Unbound components are eliminated during the washing steps. Alkaline phosphatase-labeled antibodies are cycled in and out of the SPR[®] and bind to any *Salmonella* antigens which are themselves bound to the antibodies on the SPR[®] wall. A final wash step removes unbound conjugate.

During the final detection step, the substrate (4-Methyl-umbelliferyl phosphate) is cycled in and out of the SPR[®]. The conjugate enzyme catalyzes the hydrolysis of this substrate into a fluorescent product (4-Methyl-umbelliferone) the fluorescence of which is measured at 450 nm.

At the end of the assay, results are automatically analyzed by the instrument which calculates a test value for each sample. This value is then compared to internal references (thresholds) and each result is interpreted (positive, negative).

CONTENT OF THE KIT (60 TESTS) – RECONSTITUTION OF REAGENTS

60 SLM strips	STR	Ready-to-use.
60 SLM SPR [®] s	SPR	Ready-to-use. Interior of SPR [®] s coated with anti- <i>Salmonella</i> monoclonal antibodies directed against <i>Salmonella</i> surface antigens.
SLM Standard (1 x 6 ml)	S1	Purified and inactivated <i>Salmonella</i> antigen + preservative + protein stabilizer. The confidence interval is indicated on the MLE card after the following mention: "Standard (S1) RFV Range".
SLM Positive Control (1 x 6 ml)	C1	Purified and inactivated <i>Salmonella</i> antigen + preservative + protein stabilizer. The confidence interval is indicated on the MLE card after the following mention: "Control C1 (+) Test Value Range".
Negative Control (1 x 6 ml)	C2	TRIS buffered saline (TBS) (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 + preservative. The maximum acceptable value for the test is indicated on the MLE card after the following mention: "Control C2 (-) Test Value Range".
1 MLE Card		Specifications sheet containing the factory master calibration data required to calibrate the test.
1 Package insert		

The SPR[®]

The interior of the SPR[®] is coated during production with anti-*Salmonella* monoclonal antibodies directed against *Salmonella* surface antigens. Each SPR[®] is identified by the "SLM" code. Only remove the required number of SPR[®]s from the pouch and reseal the pouch correctly after opening.

The Reagent Strip

The strip consists of 10 wells covered with a labeled, foil seal. The label comprises a bar code which mainly indicates the assay code, kit lot number and expiration date. The foil of the first well is perforated to facilitate the introduction of the sample. The last well of each strip is a cuvette in which the fluorometric reading is performed. The wells in the center section of the strip contain the various reagents required for the assay.

Continuação (ANEXO 6)

VIDAS[®] *Salmonella*

06984 K - en - 2006/07

Description of the SLM strip

Wells	Reagents
1	Sample well: dispense 500 µl of heated enrichment broth.
2	Pre-wash solution (400 µl): TBS (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 + preservative.
3 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9	Wash buffer (600 µl): TBS (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 + preservative.
6	Conjugate (400 µl): alkaline phosphatase labeled polyclonal anti- <i>Salmonella</i> antibodies + preservative.
10	Reading cuvette with substrate (300 µl): 4-Methyl-umbelliferyl phosphate (0.6 mmol/l) + diethanolamine* (0.62 mol/l or 6.6 %, pH 9.2) + preservative.

* IRRITANT reagent:

- R 36: Irritating to eyes.
 - S 26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
- For further information, refer to the Material Safety Data Sheet available on request.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Disposable Pipette to dispense 500 µl
- Water-bath (95-100°C) or equivalent system
- Stomacher[®] bag with filter
- *Salmonella* Xpress broth (bioMérieux ref. 42118, 20 tubes)

The following references are given as a guide.

- Buffered peptone water
 - 3-liter pouch (bioMérieux ref. 42629)
 - 225 ml bottle (bioMérieux ref. 42043)
 - 90 ml bottle (bioMérieux ref. 42042)
- Rappaport Vassiliadis Soy broth (RVS) (bioMérieux ref. 42110)
- Muller-Kauffmann Tetrathionate broth with novobiocin (bioMérieux ref. 42114)
- Rappaport Vassiliadis broth (RV) (bioMérieux ref. 42073)
- Selenite Cystine broth (bioMérieux ref. 42052)
- M broth (bioMérieux ref. 42077, 20 tubes)
- Selective agar:
 - Examples:
 - Hektoen agar (bioMérieux ref. 43111)
 - SM[®] ID2 agar (bioMérieux ref. 43621)
 - XLD agar (bioMérieux ref. 43563)
 - Bismuth Sulfate (Wilson-Blair agar)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For professional use only.
- Place the VIDAS[®] system in a room designed for microbiological analysis.
- This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious and handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).
- Do not use the SPR[®]s if the pouch is pierced.

- Do not use visibly deteriorated STRs (damaged foil or plastic).
- Do not use reagents after the expiration date indicated on the label.
- Do not mix reagents (or disposables) from different lots.
- Kit reagents contain sodium azide which can react with lead or copper plumbing to form explosive metal azides. If any liquid containing sodium azide is disposed of in the plumbing system, drains should be flushed with water to avoid build-up.
- The substrate in well 10 contains an irritant agent (6.6% diethanolamine). Refer to the risk phrase "R" and the precautions "S" above.
- Spills should be wiped up thoroughly after treatment with liquid detergent and a solution of household bleach containing at least 0.5% sodium hypochlorite. See the Operator's Manual for cleaning spills on or in the instrument. Do not autoclave solutions containing bleach.
- The VIDAS[®] and mini VIDAS[®] instruments should be regularly cleaned and decontaminated (see the Operator's Manual).

STORAGE CONDITIONS

- Store the VIDAS[®] SLM kit at 2-8°C.
- Do not freeze reagents.
- Store all unused reagents at 2-8°C.
- After opening the kit, check that the SPR[®] pouch is correctly sealed and undamaged. If not, do not use the SPR[®]s.
- Carefully reseal the pouch with the desiccant inside after use to maintain stability of the SPR[®]s and return the complete kit to 2-8°C.
- If stored according to the recommended conditions, all components are stable until the expiration date indicated on the label.

SAMPLES (PREPARATION)

Allow the pre-enrichment and enrichment broths to come to room temperature (18-25°C) before use.

Human and animal food products

For analysis of human and animal food products, bioMérieux recommends the following NORDVAL (for human food products only), AFNOR, DIN or BAM/AOAC approved enrichment procedures:

AFNOR (BIO 12/1-04/94) and NORDVAL (May 2005, N°2005-30-5408-00041) approved dual enrichment protocol:

Pre-enrichment

- Aseptically add X g (or X ml) of the sample to 9X ml buffered peptone water or one volume of sample to nine volumes of pre-enrichment broth.

For certain types of foods, specific preparation techniques must be followed, as described in standards ISO 6887-1 to 6887-4 and ISO 8261 (3, 4, 5, 6, 7).

Note 1: Milk powder: To obtain optimum dissolution of the product, it is recommended to first introduce the buffered peptone water into the Stomacher® bag and then sprinkle the product on the surface of the broth. Leave at room temperature for 30 minutes to allow rehydration before incubating.

Note 2: Test samples greater than 25 g were not tested during the AFNOR approval procedure.

- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 16-20 hours at 37 ± 1°C.

Enrichment

- After incubation,
 - transfer 1 ml of the suspension into 10 ml of Muller-Kauffmann Tetrathionate broth with novobiocin (MKTn).
 - Incubate for 6-8 hours at 37 ± 1°C.
- In parallel, transfer 0.1 ml of pre-enrichment suspension into 10 ml of Rappaport Vassiliadis Soy broth (RVS). Incubate for 6-8 hours at 41.5 ± 1°C.

Post-enrichment

- After incubation,
 - transfer 0.1 ml of MKTn broth into 10 ml of M broth.
 - Into another tube of M broth, transfer 1 ml of RVS broth.
 - Re-incubate the MKTn and RVS broths at their respective temperatures for 16-20 hours.
- Incubate both M broths for 16-20 hours at 41.5 ± 1°C.
- After incubation, mix each M broth and transfer 1 ml from each into one tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tubes to cool.
- Perform the VIDAS® test.
- Store the M, MKTn and RVS broths at 2-8°C in case confirmation is required.

Note: The non-heated post-enrichment broths and the selective broths can be stored for up to 24 hours at 2-8°C. The VIDAS® test and confirmation must be initiated within 24 hours following the end of incubation.

AFNOR (BIO 12/10-09/02) and NORDVAL (May 2005, N°2005-30-5408-00041) approved single enrichment protocol

Pre-enrichment

- Aseptically add X g (or X ml) of the sample to 9X ml of buffered peptone water or one volume of sample to nine volumes of pre-enrichment broth.

For certain types of foods, specific preparation techniques must be followed, as described in norms ISO 6887-1 to 6887-4 and ISO 8261.

Note 1: Milk powder: To obtain optimum dissolution of the product, it is recommended to first introduce the buffered peptone water into the Stomacher bag and then sprinkle the product on the surface of the broth. Leave at room temperature for 30 minutes to allow rehydration before incubating.

Note 2: Test samples greater than 25 g were not tested during the AFNOR approval procedure.

- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 16-20 hours at 37 ± 1°C.

Enrichment

- After incubation, transfer 0.1 ml of suspension into 10 ml of Rappaport Vassiliadis Soy broth (RVS).
- Incubate for 6-8 hours at 41.5 ± 1°C.

Post-enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of RVS broth into 10 ml of M broth.
 - Re-incubate the RVS broth for 16-20 hours at 41.5 ± 1°C.
- Incubate the M broth for 16-20 hours at 41.5 ± 1°C.
- After incubation, mix the M broth and transfer 1 ml into a tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tube to cool.
- Perform the VIDAS® test.
- Store the M and RVS broths at 2-8°C in case confirmation is required.

Note: The non-heated post-enrichment broth and the selective broth can be stored for up to 24 hours at 2-8°C. The VIDAS® test and confirmation must be initiated within 24 hours following the end of incubation.

Confirmation of positive results obtained with AFNOR and NORDVAL approved single and dual enrichment protocols

All positive VIDAS® SLM results must be confirmed. Confirmation should be performed by isolation of the enrichment broths (MKTn and RVS) on a selective agar. Identify 1 to 5 colonies according to the standard techniques described in the reference method of the CEN, ISO or AFNOR (8).

If discrepant results are obtained (positive with the alternative method, not confirmed with the reference method), the laboratory must take the necessary steps to ensure that the results obtained are accurate.

It is recommended to perform the following additional protocols:

- using the M broths, perform the VIDAS® ICS immuno-concentration (ref. 30 435) and then isolate onto 2 selective agars.
- or transfer 0.1 ml of M broth (from the RVS enrichment) into 10 ml of RVS broth, and 1 ml of M broth (from the MKTTn enrichment) into 10 ml of MKTTn broth. After incubation for 18-24 hours respectively at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ and $37 \pm 1^\circ\text{C}$, isolate onto 2 selective agars.

Easy *Salmonella* protocol approved by AFNOR (BIO 12/16-09/05) for all human food products and environmental specimens (excluding the stock-farming environment)

Pre-enrichment

- Aseptically add X g (or X ml) of the sample to 9X ml buffered peptone water.

For certain types of foods, specific preparation techniques must be followed, as described in standards ISO 6887-1 to 6887-4 and ISO 8261.

Note 1: Milk powder: To obtain optimum dissolution of the product, it is recommended to first introduce the buffered peptone water into the Stomacher® bag and then sprinkle the product on the surface of the broth. Leave at room temperature for 30 minutes to allow rehydration before incubating.

Note 2: Test samples greater than 25 g were not tested during the AFNOR approval procedure.

- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 24-26 hours at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Enrichment

- After incubation, transfer 0.1 ml of suspension into 10 ml of *Salmonella* Xpress (SX) broth.
 - Incubate for 24-26 hours at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - After incubation, mix the SX broth.
 - Transfer 1 to 2 ml into a tube. Recap the tube tightly.
 - Heat in a water bath at $95-100^\circ\text{C}$ for 15 ± 1 min. Allow the tube to cool.
 - Perform the VIDAS® test.
- Store the SX broth at $2-8^\circ\text{C}$ in case confirmation is required.

Note: The non-heated SX broth can be stored for 72 hours at $2-8^\circ\text{C}$ before the VIDAS® test is performed. Confirmation of positive results should be performed within 72 hours following the end of incubation of the selective broth at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Confirmation of positive results obtained using the Easy *Salmonella* protocol

All positive VIDAS® SLM results must be confirmed. Confirmation should be performed by isolation of the SX broth on a selective agar. Identify 1 to 5 colonies according to the standard techniques described in the reference method of the CEN, ISO or AFNOR (8).

If discrepant results are obtained (positive with the alternative method, not confirmed with the reference method), the laboratory must take the necessary steps to ensure that the results obtained are accurate.

It is recommended, for example, to perform the following additional protocol:

- Transfer 0.1 ml of SX broth in 10 ml of RVS broth.
- After incubation for 18-24 hours at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$, isolate onto a selective agar.

DIN (Ref.Nr.10121 :2000-08) approved protocol (9)

Pre-enrichment

- Aseptically add 25 g (or 25 ml) of the sample to 225 ml of buffered peptone water or one volume of sample to nine volumes of pre-enrichment broth.
- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 16-20 hours at $35-37^\circ\text{C}$.

Enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of suspension into 10 ml of Selenite Cystine broth (or dilute 1/10).
 - Incubate for 6-8 hours at $35-37^\circ\text{C}$.
- In parallel, transfer 0.1 ml of pre-enrichment broth into 10 ml of Rappaport Vassiliadis broth. Incubate for 6-8 hours at $41-42^\circ\text{C}$.

Post-enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of Selenite Cystine broth into 10 ml of M broth.
 - In another tube of M broth, transfer 1 ml of Rappaport Vassiliadis broth.
 - Re-incubate the Selenite Cystine and RV broths at their respective temperatures for 18 hours.
 - Incubate both M broths for 16-20 hours at $41-42^\circ\text{C}$.
 - After incubation, mix each M broth.
 - Transfer 1 ml of each into the same tube. Recap the tube tightly.
 - Heat for 15 ± 1 min in a water bath at $95-100^\circ\text{C}$. Allow the tubes to cool.
 - Perform the VIDAS® test.
- Store the M, Selenite Cystine and Rappaport Vassiliadis broths at $2-8^\circ\text{C}$ in case confirmation is required.

Note: if the VIDAS® assay cannot be performed immediately, the broths can be stored for up to 48 hours at $2-8^\circ\text{C}$. After 48 hours, it is preferable to freeze an aliquot part before heating.

Confirmation of positive results

Using the enrichment broths (Rappaport Vassiliadis, Selenite Cystine) and the M broths stored at $2-8^\circ\text{C}$,

- Isolate onto specific agar plates (preferably SM® ID2, HEKTOEN or any other agar validated by the laboratory).
- Incubate the agars for 24-48 hours (depending on the medium used) at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Screen for typical colonies and identify at least two per plate using standard biochemical and serological methods.

AOAC Official Method of Analysis (January 2004, n°2004.03) (10)

Pre-enrichment

- Aseptically add the sample to a non-selective pre-enrichment broth, as described by FDA/BAM guidelines.
- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 18-24 hours at 35 ± 1°C.

Enrichment

- After incubation, transfer 1 ml of the suspension into 10 ml of Tetrathionate broth.
- Incubate for 6-8 hours at 41-42°C (for all food other than raw foods or foods with a high microbial load).
- In parallel, transfer 0.1 ml of the pre-enrichment broth into 10 ml of Rappaport Vassiliadis (RV) broth. Incubate for 6-8 hours at 41-42°C (for all food other than raw foods or foods with a high microbial load). For raw foods or foods with a high microbial load incubate broths 18-24 hours.

Post-enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of RV broth into 10 ml of M broth.
 - Into another tube of M broth, transfer 1 ml of Tetrathionate broth.
- For all foods other than raw foods or foods with high microbial load, incubate M broths 18-24 hours at 41-42°C.
- For raw foods or foods with high microbial load incubate M broths 6-8 hours at 41-42°C.
- Re-incubate selective enrichment broths at 41-42°C for total incubation time of 24 ± 2 hours, to be used for confirmation of positive VIDAS® results.
- After incubation, mix each M broth.
- Transfer 1 ml from each into one tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tubes to cool.
- Perform the VIDAS® assay.
- Store M broth and selective broths at 2-8°C in case confirmation is required.

Note: if the VIDAS® assay cannot be performed immediately, the non-heated enrichment broths can be stored for up to 48 hours at 2-8°C.

Confirmation of positive results

Using the enrichment broths (Rappaport Vassiliadis and Tetrathionate) and the M broths stored at 2-8°C,

- Isolate onto specific agar plates (HEKTOEN, XLD, Bismuth Sulfate) following standard procedures.
- Incubate the plates.
- Confirm suspect colonies.

AOAC Official Method of Analysis (May 1996, n°996.08) (10, 11)

Pre-enrichment

- Aseptically add the sample to a non-selective pre-enrichment broth, as described by FDA/BAM guidelines.
- Mix in a Stomacher® bag.
- Incubate for 24 ± 2 hours at 35°C.

Enrichment

- After incubation, transfer 1 ml of the suspension into 10 ml of Tetrathionate broth.
- Incubate for 6-8 hours at 42°C (18 ± 2 hours for raw meat products).
- In parallel, transfer 1 ml of the pre-enrichment broth into 10 ml of Selenite Cystine broth. Incubate for 6-8 hours at 35°C (18 ± 2 hours for raw meat products).

Post-enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of Selenite Cystine broth into 10 ml of M broth.
 - Into another tube of M broth, transfer 1 ml of Tetrathionate broth.
 - Re-incubate the Selenite Cystine and Tetrathionate broths at their respective temperatures for a total incubation period of 24 ± 2 hours.
- Incubate both M broths for 18 hours at 42°C (6 hours for raw meat products).
- After incubation, mix each M broth and transfer 1 ml from each into one tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tubes to cool.
- Perform the VIDAS® assay.
- Store M broth and selective broths at 2-8°C in case confirmation is required.

Note: if the VIDAS® assay cannot be performed immediately, the non-heated enrichment broths can be stored for up to 48 hours at 2-8°C.

Confirmation of positive results

Using the enrichment broths (Tetrathionate and Selenite Cystine) and the M broths stored at 2-8°C,

- Isolate onto specific agar plates (HEKTOEN, XLD, Bismuth Sulfate) following standard procedures.
- Incubate the plates.
- Confirm suspect colonies.

Environmental samples

Agri-food production environment

Given the diversity of manufacturing processes, bioMérieux recommends you to validate the following protocol:

Pre-enrichment

- Dilute the sample 1/10 in buffered peptone water. For surface samples which may contain residual disinfectant, it is recommended to use a 10% neutralizing agent (Lecithin-Polysorbate-L, Histidine-Sodium thiosulfate) (11) on the sampling pad, sponge or swab and in the pre-enrichment broth.
- Incubate for 16-20 hours at 37 ± 1°C.

Continuação (ANEXO 6)

VIDAS[®] *Salmonella*

06984 K - en - 2006/07

Enrichment

- After incubation, transfer 1 ml of the suspension into 10 ml of Selenite Cystine broth (or dilute 1/10).
- Incubate for 18-24 hours at 35-37°C.
- In parallel, transfer 0.1 ml of pre-enrichment broth into 10 ml of Rappaport Vassiliadis broth. Incubate for 18-24 hours at 41 ± 1°C.

Post-enrichment

- After incubation,
 - Transfer 1 ml of Selenite Cystine broth into 10 ml of M broth.
 - Into another tube of M broth, transfer 1 ml of Rappaport Vassiliadis broth.
 - Re-incubate the Selenite Cystine and Rappaport Vassiliadis broths at their respective temperatures.
- Incubate both M broths for a minimum of 6 hours at 41 ± 1°C.
- After incubation, mix each M broth and transfer 1 ml from each into one tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tubes to cool.
- Perform the VIDAS[®] test.
Store M, Selenite Cystine and Rappaport Vassiliadis broths at 2-8°C for confirmation.

Confirmation of positive results

- Using the enrichment broths (Rappaport Vassiliadis, Selenite Cystine) and the M broths stored at 2-8°C,
- Isolate onto specific agar plates (preferably SM[®] ID2, HEKTOEN or any other agar validated by the laboratory).
 - Incubate the agars for 24-48 hours (depending on the medium used) at 37 ± 1°C.
 - Screen for typical colonies and identify at least two per plate using standard biochemical and serological methods.

Stock-farming environment

Pre-enrichment

- Dilute the sample 1/10 in buffered peptone water. Sample volumes and volumes of pre-enrichment broth depend on the type of sample and are defined in the COFRAC reference texts.
For surface samples which may contain residual disinfectant, it is recommended to use a 10% neutralizing agent (Lecithin-Polysorbate-L. Histidine-Sodium thiosulfate) (12) on the sampling pad, sponge or swab and in the pre-enrichment broth.
- Incubate for 16-20 hours at 37 ± 1°C (4 hours of incubation are sufficient for fecal matter).

Enrichment

- After incubation, transfer 1 ml of the suspension into 10 ml of Muller-Kauffmann broth (or dilute 1/10).
- Incubate for 18-24 hours at 41 ± 1°C.

Post-enrichment

- After incubation, transfer 0.1 ml of Muller-Kauffmann broth into 10 ml of M broth (imperatively preheated at 41 ± 1°C).
- Incubate for a minimum of 6 hours at 41 ± 1°C. Incubation can be extended to up to 24 hours.
- After incubation, mix the M broth and transfer 1 ml into a tube. Recap the tube tightly.
- Heat for 15 ± 1 minutes in a water bath at 95-100°C. Allow the tubes to cool.
- Perform the VIDAS[®] test.
Store non-heated M broth at 2-8°C in case confirmation is required.

Note: The post-enrichment broth (M broth) can be stored for up to 24 hours at 2-8°C before the VIDAS[®] test is performed.

Confirmation of positive results

- Using the non-heated M broth,
- Perform the VIDAS[®] ICS immuno-concentration (bioMérieux ref. 30435), followed by spreading on SMI[®] D2 agar (see VIDAS[®] ICS package insert).
 - Incubate the agar at 37 ± 1°C for 24 hours.
 - Identify typical colonies.

Caution: any deviation from the recommended protocols must be validated prior to use.

INSTRUCTIONS FOR USE

For complete instructions, see the VIDAS[®] or mini VIDAS[®] Operator's Manual.

Master lot data entry

Before each new lot of reagents is used, specifications (or factory master calibration curve data) must be entered into the instrument (VIDAS[®] or mini VIDAS[®]) using the master lot entry (MLE) card (specifications sheet) included in each kit. If this operation is not performed **before initiating the tests**, the instrument will not be able to print results. The master lot data need only be entered once for each lot.

It is possible to enter data automatically using the MLE card or manually.

Calibration

Calibration, using the standard provided in the kit, must be performed each time a new lot of reagents is opened, after the master lot data have been entered. Calibration should then be performed every 14 days. This operation provides instrument-specific calibration curves and compensates for possible minor variations in assay signal throughout the shelf-life of the kit.

The standard, identified by S1, must be tested in **duplicate** (see Operator's Manual). The standard value must be within the set RFV "Relative Fluorescence Value" range. If this is not the case, recalibrate.

Procedure

1. Only remove the required reagents from the refrigerator and allow them to come to room temperature for at least 30 minutes.
2. Use one "SLM" strip and one "SLM" SPR® for each sample, control or standard to be tested. Make sure the storage pouch has been resealed after the required SPR®s have been removed.
3. Type or select "SLM" to enter the test code. The standard must be identified by "S1", and tested in duplicate. If the positive control is to be tested, it should be identified by "C1". If the negative control needs to be tested, it should be identified by C2.
4. Mix the standard, controls and samples using a vortex-type mixer.
Note: Heating samples using a water-bath for 15 minutes is essential prior to performing the VIDAS® SLM test.
5. Pipette 500 µl of standard, sample or control into the sample well.
6. Insert the SPR®s and the strips into the instrument. Check to make sure the color labels with the assay code on the SPR®s and the Reagent Strips match.
7. Initiate the assay as directed in the Operator's Manual. All the assay steps are then performed automatically by the instrument. Results are obtained within approximately 45 minutes.
8. After the assay is completed, remove the SPR®s and strips from the instrument.
9. Dispose of the used SPR®s and strips into an appropriate container.

RESULTS AND INTERPRETATION

Once the assay is completed, results are analyzed automatically by the instrument. Fluorescence is measured twice in the Reagent Strip's reading cuvette for each sample tested.

The first reading is a background reading of the substrate cuvette before the SPR® is introduced into the substrate. The second reading is taken after incubating the substrate with the enzyme remaining on the interior of the SPR®.

The RFV (Relative Fluorescence Value) is calculated by subtracting the background reading from the final result. This calculation appears on the result sheet.

The RFV obtained for each sample is interpreted by VIDAS® as follows :

$$\text{Test Value} = \frac{\text{sample RFV}}{\text{standard RFV}}$$

Thresholds and Interpretations

Test Value Threshold	Interpretation
< 0.23	Negative
≥ 0.23	Positive

The printed report includes:

- the type of test performed,
- the sample identification,
- the date and time,
- the lot number and expiration date of the kit,
- the RFV, Test Value and interpreted result for each sample.

A result with a test value that is less than the threshold value indicates that the sample does not contain *Salmonella* antigen or contains *Salmonella* antigen at a concentration below the detection limit.

A result with a test value greater than or equal to the threshold value indicates a sample contaminated with *Salmonella*. In this case, refer to one of the sections on "Positive results confirmation".

Invalid results are reported:

- when the background reading is above a pre-determined cut-off (indicating substrate contamination). In this case, repeat the assay with the heated broth or the reagent concerned (S1, C1 or C2).
- if there is no standard available for the lot number indicated on the sample strip. In this case, run a standard in duplicate using SLM strips with the same lot number as the invalid sample test. The sample test result can then be recalculated using these new stored standards. See the Operator's Manual for more information.

QUALITY CONTROL

One positive and one negative control are included in each VIDAS® *Salmonella* kit.

These controls must be performed immediately after opening a new kit to ensure that reagent performance has not been altered. Each calibration must also be checked using these controls. The instrument will only be able to check the control values if they are identified by C1 and C2.

Results cannot be validated if the positive control value deviates from the expected values.

Note

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any applicable local regulations.

LIMITATIONS OF THE METHOD

Any change or modification in the procedure may affect the results.

Caution

The VIDAS® SLM assay has been evaluated on a large number of products. However, given the wide variety of products and manufacturing procedures, it is recommended to check that the composition of the matrices tested does not affect the reliability of VIDAS® SLM results.

PERFORMANCE

The VIDAS® *Salmonella* assay detects both motile and non-motile *Salmonella*, including serotypes *Typhi* and *Paratyphi*.

Over 300 strains covering the major O and H groups have been tested and were detected using the VIDAS® SLM assay.

Some cross-reactions can be observed with certain strains of *Citrobacter* or *Hafnia*, etc.

Easy *Salmonella* protocol

During AFNOR approval, the preliminary study gave the following results:

- **Inclusivity:** all 52 strains of *Salmonella* tested were detected.
- **Comparative study:** with the 359 samples tested simultaneously using VIDAS® Easy *Salmonella* and the ISO 6579 method, the following results were obtained:
 - Additional positive results with VIDAS® Easy SLM: 3
 - False negative results with VIDAS® Easy SLM: 5
 - Concordant results: 351

Single and dual enrichment protocols

During AFNOR approval, the preliminary study gave the following results:

- **Inclusivity:** all 51 strains of *Salmonella* tested were detected.
- **Exclusivity:** among the 30 non-*Salmonella* strains tested, 2 strains of *Citrobacter* revealed cross-reactivity.
- **Relative detection level:**
 - **BIO-12/1-04/94 protocol:** the VIDAS® SLM method and the ISO 6579 reference method have the same 50% detection limit: 0.3-1.4 cells / 25 g.
 - **BIO-12/10-09/02 protocol:** the 50% detection limit is 0.3-1.7 cells / 25 g for VIDAS® SLM and 0.3-1.4 cells / 25 g for the ISO 6579 reference method.
- **Comparative study:** 328 samples were tested simultaneously using the VIDAS® SLM assay and the ISO 6579 method (8).
 - **BIO 12/1-04/94 protocol:**
 - False negative results with the VIDAS® SLM method: 1
 - Additional positive results with the VIDAS® SLM method: 0
 - Concordant results: 327
 - **BIO 12/10-09/02 protocol:**
 - False negative results with the VIDAS® SLM method: 2
 - Additional positive results with the VIDAS® SLM method: 0
 - Concordant results: 326

The performance data were obtained using bioMérieux culture media.

The NORDVAL approval confirms a detection limit of 1-10 cells per 25 g of sample with the recommended enrichment procedure.

Preliminary studies which were performed as part of the normalization of *Salmonella* tests by the DIN (German Normalization Institute) using meat products (140 samples) and dehydrated milk products (100 samples) compared with paragraph 35 LMBG (L 00.00-20), gave the following results:

- **Meat products:**
 - Sensitivity: 100%
 - Specificity: 99%
- **Dehydrated milk products:**
 - Sensitivity: 101.5%
 - Specificity: 100%

The following results were obtained for the external evaluation using 533 stock-farming environment samples compared with the method recommended in the program 116 of COFRAC:

	VIDAS® SLM	COFRAC Method
Number of samples	533	533
Samples reported negative for both methods	408	408
Positive samples confirmed	121	119
False negative samples	4	6
Sensitivity	97%	95%
Positive samples not confirmed	13	NA
Percentage of false positive samples compared with false negative samples	3%	NA

The VIDAS® *Salmonella* single and dual enrichment protocols were approved by AFAQ AFNOR Certification as an alternative method for the analysis of all human and animal food products.

Validation was obtained in relation to the reference method described in the international ISO 6579 standard (8) according to the ISO 16140 reference standard (13).

The BIO-12/1-04/94 (dual path protocol) certification is valid until 9 June 2010 and can be obtained from our Technical Assistance.

The BIO-12/10-09/02 (single path protocol) certification is valid until 18 September 2010 and can be obtained from our Technical Assistance.

BIO 12/1 - 04/94
BIO 12/10 - 09/02
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification
www.afnor.org

The VIDAS[®] Easy Salmonella protocol was approved by AFAQ AFNOR Certification on 20/09/05 as an alternative method for the analysis of all human food products and environmental specimens (excluding the stock-farming environment). Validation was obtained in relation to the reference method described in the international ISO 6579 standard (8) according to the ISO 16140 reference standard (13). The BIO-12/16-09/05 certification is valid until 20/09/2009 and can be obtained from our our Technical Assistance.

BIO 12/16 - 09/05
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFAQ AFNOR Certification
www.afnor.org

Two VIDAS[®] SLM protocols for the detection of Salmonella in food products were validated by the AOAC: AOAC Official Method 996.08 and AOAC Official Method 2004.03.

VIDAS[®] SLM was validated and approved by the NORDVAL method (May 2005, No. 2005-30-5408-00041), as a rapid method for the analysis of all human food products. This validation was obtained in relation to the reference method described in the ISO 6579 (8) and NMKL nr 71: 1991 standards.

VIDAS[®] SLM is a method approved by Health Canada (nr. MFHPB-24).

The VIDAS[®] SLM method was successfully evaluated by the European Microbiological Method Assessment Scheme (EMMAS) in Great-Britain (Oct. 98, report N°37490).

The VIDAS[®] SLM method was normalized by the DIN (German Normalization Institute) in August 2000 for detection of Salmonella in food products (Ref. Nr.10121 :2000-08).

WASTE DISPOSAL

Dispose of used or unused reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

USE / VALIDATION STATEMENT

Performance characteristics for the System for any use outside the labeling, package insert or operator's manual have not been established. Customer therefore acknowledges and agrees that bioMérieux, Inc. makes no claims, representations, warranties or guarantees for use of the System other than as specifically set forth in the applicable package insert and/or operator's manual. bioMérieux specifically disclaims all warranties, express or implied, OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE and disclaims all liability, whether direct, indirect or consequential, for any use other than as set forth in the applicable package insert and/or operator's manual. IN NO EVENT SHALL bioMérieux's LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO bioMérieux FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM. Customer acknowledges and agrees that it is Customer's sole and exclusive responsibility to validate the System for any such intended use, and to determine whether the System is suitable for that intended use. The performance of any validation studies, and the subsequent use of the System based on Customer's studies shall be the Customer's sole risk and responsibility.

LITERATURE REFERENCES

1. KERR S., BALL H. J., MACKIE D.P., et al. - Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella* - *Journal of Applied Bacteriology* - 1992, vol. 72, p. 302-308.
2. LE MINOR, L. - *Salmonella* lignières - In KRIEG N.R. and HOLT J.G. - *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Ed. Williams and Wilkins - Baltimore, MD., 1984 - vol. 1, p. 427-458
3. *Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.* - ISO 6887-1 - 1999.
4. *Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 2 : Règles spécifiques pour la préparation des viandes et des produits carnés.* - ISO 6887-2 - 2003
5. *Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 3 : Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche.* - ISO 6887-3 - 2003
6. *Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.* - ISO 6887-4 - 2003
7. *Lait et produits laitiers - Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique* - ISO 8261 - 2001.
8. *Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.* - ISO 6579 - 2002.
9. *Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mittels enzymgebundenen Fluoreszenz-immunoassays* - DIN 10121 - August 2000.
10. *Bacteriological Analytical Manual* - Chapter 5 : *Salmonella* - U.S. Food and Drug Administration - 2001 - <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-toc.html>.
11. CURIALE et al. - *Journal of AOAC* - 1997, vol. 80, p. 469-504.

Continuação (ANEXO 6)

VIDAS® *Salmonella*

06984 K - en - 2006/07

12. Méthode d'analyse en santé animale : Isolement et identification des *Salmonella* ou de recherche de sérovar(s) particulier(s) de dans l'environnement des productions animales. - NF U47-100 - février 2005.
13. Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives. - ISO 16140 - 2003.

INDEX OF SYMBOLS

Symbol	Meaning
GB : Catalogue number US : Catalog number
Manufacturer
Temperature limitation
Use by
Batch code
Consult Instructions for Use
Contains sufficient for <n> tests

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL bioMérieux's LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO bioMérieux FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

Stomacher is a used, pending and/or registered trademark belonging to Seward Ltd.

B I O M É R I E U X

bioMérieux® SA
au capital de 12 029 370 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tel. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

Printed in France

bioMérieux, the blue logo, VIDAS, SPR, and SM are used, pending and/or registered trademarks belonging to bioMérieux SA or one of its subsidiaries.

ANEXO 7– Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

Singlepath Salmonella

1.04140.0001

GLISA

Singlepath® Salmonella

GLISA-Rapid Test (Gold Labelled Immuno Sorbent Assay) for the qualitative detection of Salmonella spp in food

25 Tests

Introduction

Salmonella is one of the most common causes of food poisoning world-wide. Salmonella have been isolated from most types of raw food (meats, eggs, as well as plant products), and their high resistance to drying combined with a very high heat resistance once dried, makes Salmonella a potential problem in most foods and in particular in dried products.

Screening for the presence of Salmonella in foods by conventional methods involve a 3-step technique: non-selective pre-enrichment (18–24 h), selective enrichment in (at least) two different selective broth media (24–48 h) followed by plating on (at least) two different selective/indicative agars (24–48 h). This leads to a total time for Yes/No screening result of up to 5 days. For products where a positive release system is enforced, this means a delay of 5 days before release of the product.

The Singlepath Salmonella test is performed only from one selective enrichment culture, and gives a Yes/No answer in 20 minutes, meaning that products can be released 2 days earlier than by conventional microbiology.

Singlepath Salmonella is an immunological screening test based on the immune flow principle and is designed in such a way that time-consuming and personnel intensive working steps are avoided.

Principle

Singlepath Salmonella is an immunochromatographic rapid test based on gold-labelled antibodies. The test device has a circular sample port, and an oval-shaped test (T) and control (C) window.

- 1 The sample is applied to the chromatography paper via the circular sample port.
- 2 The sample is absorbed through the pad to the reaction zone containing colloidal, gold-labelled antibodies specific to Salmonella spp.
- 3 Any Salmonella antigen present complexes with the gold-labelled antibody and migrates through the port until it encounters a binding reagent zone in the test (T) area.
- 4 The binding zone (T) contains another anti-Salmonella Antibody, which immobilises any Salmonella-antibody complex present. Due to the gold-labelling, a distinct red line is then formed.
- 5 The rest of the sample continues to migrate to a second binding reagent zone within the control (C) zone and also forms a second distinct red line (positive control). Regardless of whether any Salmonella is present or not, this distinct red line is always formed in the control (C) zone, thus ensuring the test is working correctly.

Storage/Stability

Singlepath Salmonella is stable until the expiry date printed on the box, when stored at +2 to +8 °C.

Materials required for the test

Package contents

25 test devices (individually pouched in aluminium foil)

Additionally required materials and instrumentation

1. Enrichment media, e.g. 1.07228. Peptone Water (Buffered), 1.07700. Salmonella Enrichment Broth acc. to Rappaport-Vassiliadis (RVS broth).
2. Stomacher/Stomacher bags
3. Incubators + 37 °C and + 41.5 °C
4. Distilled or deionized water
5. Autoclave
6. Waterbath for boiling of samples
7. Disposable heat-stable Polypropylene tubes for boiling of samples
8. Disposable plastic transfer pipettes and/or appropriate micro pipettes and disposable tips for dispensing 1–2 ml (sample for boiling) and 160 µl (application of boiled sample onto tests)

Continua

Continuação (ANEXO 7)

Sample material/sample enrichment

- Mix 25 g solid sample or 25 ml liquid sample with 225 ml pre-enrichment broth (BPW) and homogenise in stomacher if necessary.
- Incubate for 18–24 h at +37 °C.
- Inoculate 10 ml RVS selective enrichment broth with 0.1 ml of pre-enrichment culture.
- Incubate for 24 ± 3 h at 41.5 °C (if a different selective enrichment broth is used, follow recommendations for incubation time/temperature).

Test procedure

● Sample preparation

1. Transfer approx. 1–2 ml of selective enrichment culture to an appropriate (polypropylene) tube.
2. Place tubes in boiling water bath for 15 min.
3. Remove and allow cooling to room temperature.

● Procedure

1. Remove the foil pouches from the required number of Singlepath Salmonella devices.
Place the test device(s) on a flat surface and label with appropriate sample identification.

2. Using a disposable transfer pipette, draw up a sample from the boiled, cooled enrichment.

3. Dispense five (5) free falling drops (about 160 µl) into the circular sample port on the test device.
Alternatively using a micro pipette and disposable pipette tip, dispense 160 µl sample into the circular sample port on the test device.

4. Observe the test result 20 minutes after applying the sample to the device.

● Interpretation of results

The test can be regarded as working correctly if a distinct red line appears in the control zone (C) within 20 minutes.
A sample can be considered POSITIVE if at or prior to 20 minutes, red lines appear on both test (T) and control (C) zones.
A sample can be considered NEGATIVE if no red line appears in the test (T) zone but does appear distinctly in the control (C) zone 20 minutes after application of sample to the device.

Technical specifications

Detection limit

Depending on serogroup, a range of approx. 10^4 – 10^7 bacteria/ml can be regarded as being the lower detection limit.

Interferences

Results obtained to date on numerous food samples indicate that there is no interference of Singlepath Salmonella with food ingredients.

Trouble-shooting

Problem

No line appears in either zone (C) after 20 minutes test period.

Delay in sample reaching Nitro-cellulose membrane.

Measures

Re-run sample.

Touch sample pad with pipette tip.

ANEXO 8 – Protocolo analítico fornecido pelo fabricante:

1-2 Test

1-2Test®

AOAC Official Method 989.13

BIOCONTROL

Results. Right now.

General Description

The 1-2 Test is a rapid qualitative method for the detection of motile *Salmonella* in foods, food ingredients and environmental samples. It is based on the observation of *Salmonella* immobilized in motility medium by polyvalent H (flagellar) antibodies. Immobilization of motile *Salmonella* results in development of well-defined band of cells (ImmunoBand™).

Using the 1-2 Test

A. Sample Preparation and Enrichment

Pre-Enrichment

Prepare samples according to procedures described in the current edition of the Bacteriological Analytical Manual (BAM). Incubate 24 ± 2 h at $35-37^{\circ}\text{C}$.

For all samples with exception of raw flesh and highly contaminated products proceed to B. Test Procedure.

For raw flesh and highly contaminated products Selective Enrichment

Transfer 1 mL incubated pre-enrichment mixture to 9 mL iodine-activated tetrathionate brilliant green broth (TBG). Gently vortex mixture. Incubate 6-8 h in a $42^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$ water bath.

B. Test Procedure

Each step of the preparation sequence can be performed on an individual unit or simultaneously on multiple units. Sample numbers can be recorded 1) on lower half of motility chamber but must not interfere with reading results, or 2) on flat surface of white cap.

(a) Addition of Iodine-Iodide Solution

For all samples with exception of raw flesh and highly contaminated products

Position 1-2 Test unit with black cap UP and remove cap. Add 1 drop of Reagent #1 (Iodine-Iodide Solution) to inoculation chamber. Replace cap and gently shake unit to mix.

NOTE: This step is not performed for raw flesh and highly contaminated products because tetrathionate broth incubation is conducted in a test tube.

(b) Chamber Plug Removal

Reposition 1-2 Test unit with black cap UP and remove cap. Remove chamber plug with sterile forceps and discard plug. If chamber plug is not removed, bacteria will be unable to move from inoculation chamber to motility chamber.

(c) Inoculation

Prior to inoculation, be sure that enrichment broth containing sample is well-mixed.

For all samples with exception of raw flesh and highly contaminated products

Transfer 0.1 mL enriched sample into inoculation chamber.

For raw flesh and highly contaminated products Transfer 1.5 mL of tetrathionate broth from 42°C incubation to the previously emptied inoculation chamber.

(d) Gel Void Former Tip Removal

Position 1-2 Test unit with white cap UP and remove cap. Snip off tip of gel void former with shears and discard tip. The cut should be made at point where tip meets base of gel void former.

(e) Addition of Antibody Preparation

Add 1 drop of Reagent #2 (Antibody Preparation) to gel void in motility chamber. Replace white cap. One drop of Reagent #2 should uniformly fill lower two-thirds of gel void. This can be determined by observing blue antibody solution in void. Do not add more than 1 drop.

(f) Incubation

Place inoculated 1-2 Test units in incubator with white cap UP. Incubate units for 14 h to 30 h at $35-37^{\circ}\text{C}$. 1-2 Test units may be incubated individually or while held in incubation tray.