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

Detecção de *Salmonella* em alimentos crus de origem animal empregando os imunoensaios rápidos TECRA™ *Salmonella* VIA, TECRA™ *Salmonella* UNIQUE e o método convencional de cultura.

ANA MARIA RAMALHO DE PAULA

Dissertação para obtenção
de grau de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2002

ANA MARIA RAMALHO DE PAULA

**Detecção de *Salmonella* em alimentos crus de origem animal
empregando os imunoensaios rápidos TECRA™ *Salmonella* VIA,
TECRA™ *Salmonella* UNIQUE e o método convencional de cultura.**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção de grau de mestre

Prof. Dr. Bernadette D. G. M. Franco
Orientadora /Presidente

Prof. Dr. Suzana Marta Issay Saad
1º examinador

Prof. Dr. Mariza Landgraf
2º examinador

São Paulo, 22 de Março de 2002.

PARA

*Antônio de Paula e Maria da Anunciação de Paula,
meus pais pelo carinho, apoio, dedicação, e incentivos
ao longo de todos estes anos, que tanto contribuíram
para a minha formação pessoal quanto profissional.*

*João e Paulo, meus irmãos, que sempre compartilharam
de todos os momentos e me apoiaram com entusiasmo.*

AGRADEÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a . Dr^a. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pela orientação, amizade, paciência, confiança e estímulo na realização deste trabalho.

À Dr^a . Dilma Scala Gelli, pelo apoio, orientação, estímulo, e esforço dedicado para o meu aprimoramento profissional.

Ao Dr. Odair Zenebon, pela oportunidade e estímulo.

À Dr^a . Elza S. Gastaldo Badolato, pela confiança e oportunidade.

À Dr^a. Miyoko Jakabi, pelo apoio, compreensão e incentivos.

Aos colegas, funcionários e estagiários da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio e amizade.

À Madasa, representante no Brasil da Tecra Diagnostics, na pessoa do Sr. Marcel Lincoln L. Duarte, pela cessão dos "kits" TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE.

À Alexandra S. Papasidero, estagiária da FUNDAP, pela ajuda na obtenção das amostras para análise, pelo incentivo e ótima convivência diária

À todos os funcionários da Seção de Meios de cultura do Instituto Adolfo Lutz, em especial a Julia Taeko U. Yoshida, pelo fornecimento de meios de cultura.

À funcionária Ana T. Tavechio do Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia Médica do Instituto Adolfo Lutz pela sorotipagem das cepas de *Salmonella*.

Aos Profs. Drs. Mariza Landgraf, Suzana Marta Issay Saad e José Paes de Almeida Nogueira Pinto, pelas análises críticas e sugestões feitas no exame de qualificação.

Às Bibliotecárias Leila e Adriana, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e do Instituto Adolfo Lutz.

Às secretárias Angela, Mônica e Izabel pelos serviços prestados.

À Bene, Elaine e Jorge da secretaria de Pós-graduação pela atenção prestada.

Ao Marcos pelo auxílio na formatação final da dissertação.

A todos que mesmo indiretamente colaboraram com este trabalho.

SUMÁRIO

	página
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Amostra para análise.....	14
3.2. Análises microbiológicas.....	14
3.2.1. Metodologia convencional de cultura.....	15
3.2.2. TECRA Salmonella VIA.....	17
3.2.3. TECRA Salmonella UNIQUE.....	22
3.3. Avaliação dos Resultados.....	27
4. Resultados e Discussão.....	28
5. Conclusões.....	41
6. Referências Bibliográficas.....	42
7. Resumo.....	48
8. Abstract.....	49

FIGURAS

	página
Figura 1. Foto do “kit” TECRA Salmonella VIA.....	17
Figura 2. Foto do cartão comparativo de cores do “kit” TECRA Salmonella VIA.....	21
Figura 3. Foto do “kit” TECRA Salmonella UNIQUE.....	22
Figura 4. Foto do bastão do “kit” TECRA Salmonella UNIQUE.....	25
Figura 5. Fluxograma descritivo das etapas empregadas nos três métodos de detecção de <i>Salmonella</i>	26
Figura 6. Quadro comparativo do tempo necessário para desenvolvimento dos três métodos para detecção de <i>Salmonella</i> em alimentos.....	40

TABELAS

página

Tabela 1. Sorotipos de <i>Salmonella</i> detectados nas amostras de alimentos.....	28
Tabela 2. Desempenho dos procedimentos de cultura convencional, TECRA <i>Salmonella</i> VIA e TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE na detecção de <i>Salmonella</i> em 45 amostras positivas de alimentos.....	29
Tabela 3. Número de amostras positivas confirmadas e negativas para <i>Salmonella</i> pelo método convencional e pelo sistema TECRA <i>Salmonella</i> VIA.....	30
Tabela 4. Número de amostras positivas confirmadas e negativas para <i>Salmonella</i> pelo método convencional e pelo sistema TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE.....	31
Tabela 5. Número de amostras positivas e negativas para <i>Salmonella</i> pelo sistema TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE e pelo sistema TECRA <i>Salmonella</i> VIA.....	32
Tabela 6. Positividade para <i>Salmonella</i> em alimentos de acordo com o método analítico.....	34

1- INTRODUÇÃO

Características gerais de *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e consiste de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de endosporos. Quando móveis possuem flagelos peritríquios. As colônias têm geralmente 2 a 4 mm de diâmetro, são oxidase negativa, crescem em meios de cultura artificiais, e fermentam a glicose com formação de ácido e gás. As bactérias do gênero *Salmonella* são capazes de produzir gás sulfídrico detectável em ágar Tríplice Açúcar Ferro Lisina, utilizam citrato, reduzem nitrato a nitrito e a maioria descarboxila lisina e ornitina. Não produzem urease e indol, e não desaminam os aminoácidos fenilalanina e triptofano (Le MINOR, 1984).

O gênero *Salmonella* consiste de apenas duas espécies: *S. enterica*, dividida em seis subespécies: (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, e *indica*) e *S. bongori*. Essas duas espécies contêm atualmente 2501 sorotipos. Para fins de designação desses sorotipos, costuma-se escrever o gênero *Salmonella* em itálico acrescido apenas do sorotipo em letras romanas, iniciando com letra maiúscula. Por exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis costuma ser escrito apenas como *Salmonella* Enteritidis (ou *S. Enteritidis*).

Esta nomenclatura reflete a taxonomia atual de *Salmonella* (POPOFF et al., 2001).

Para propósitos epidemiológicos, as salmonelas podem ser classificadas em 3 grupos:

- Sorotipos adaptados ao homem, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi C*. Este grupo inclui os agentes das febres tifóide e paratifóide, que são as doenças mais severas causadas por *Salmonella*. A febre tifóide caracteriza-se por um período de incubação longo, desenvolvimento de altas temperaturas corporais e alta taxa de mortalidade se não houver tratamento. *S. Typhi* pode ser isolada do sangue e algumas vezes da urina de pacientes. A síndrome paratifóide é mais branda que a tifóide. Estes sorotipos usualmente não são patogênicos para os animais.
- Sorotipos altamente adaptados a animais, como *S. Gallinarum* (aves), *S. Dublin* (gado bovino), *S. Abortus-equi* (cavalos), *S. Abortus-ovis* (ovelha) e *S. Choleraesuis* (suínos).
- Sorotipos ubíquos, como *S. Typhimurium*, que afetam tanto o homem quanto os animais, causando infecções gastrointestinais de severidade variável, mas menos severas que a febre entérica. Incluem a maioria dos sorotipos transmitidos por alimentos (VARNAM E EVANS, 1991).

Salmonella pode colonizar ou infectar uma grande variedade de animais domésticos e de criação para abate. Roedores, pragas e répteis podem atuar como reservatórios e vetores de *Salmonella*.

As salmoneloses em animais e humanos podem ser uma doença de prognóstico leve com sintomas somente gastrointestinais, como também uma doença severa e comprometedora. Cada espécie animal responde diferentemente aos sorotipos específicos, e também a sintomatologia da salmonelose varia de acordo com a espécie infectada, o sorotipo infectante, e as condições gerais do animal infectado (ex: idade e fatores de saúde) (PROST e RIEMANN, 1967, JAY, 2000).

Segundo D' Aoust et al, 2002, as salmoneloses humanas podem ocorrer como uma de três síndromes:

1 - Bacteremia ou septicemia por *Salmonella* não tifóide, que pode resultar da infecção com alguns sorotipos de *Salmonella*. Estas infecções sérias estão associadas com somente poucos sorotipos (ex: *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, e *S. Paratyphi*). As salmoneloses sistêmicas podem tornar-se doenças severas com sequelas e morte e os sobreviventes podem tornar-se portadores crônicos assintomáticos da bactéria.

2 - Febre tifóide verdadeira (febre entérica) que é causada por infecção com *Salmonella Typhi*. A taxa de mortalidade pode exceder 10% em pacientes sem tratamento, mas são inferiores a 1% em pacientes tratados.

Os sobreviventes podem tornar-se portadores crônicos assintomáticos.

3 - Gastroenterite (ou enterocolite) por *Salmonella*, que pode ser causada por alguns dos vários sorotipos de *Salmonella* exceto *S. Typhi*. A doença é geralmente auto-limitante com diarreia prolongada mas de severidade moderada.

Além disso, têm importância os portadores assintomáticos, uma vez que a veiculação de *Salmonella* pelo homem após uma infecção com sorotipos adaptados a humanos é um fenômeno comum. A excreção assintomática pode continuar por semanas, meses ou anos, usualmente pelas fezes, mas também pela via urinária.

Entre os 2501 sorotipos de *Salmonella* já descritos somente uma fração deles está relacionada com doenças em humanos. Em determinados períodos de tempo, considerando-se algumas décadas, observou-se que havia prevalência de apenas 2 a 3 sorotipos nas infecções humanas (VARNAM e EVANS, 1991, POPOFF e LE MINOR, 1997).

Levantamentos realizados nos Estados Unidos, onde os surtos são notificados de forma mais sistematizada, revelam que, no período de 1988 a 1992, ocorreram 549 surtos por *Salmonella*, correspondendo a 69% do total de surtos de etiologia conhecida. Destes, 60% foram causados por *S. Enteritidis*, o que demonstra a importância deste sorotipo no período considerado (BEAN et al., 1997).

Outro dado importante é a capacidade de *S. Enteritidis* causar infecções extra-intestinais, inclusive com casos fatais. Nos países da Europa, os dados existentes revelam situação semelhante à descrita nos Estados Unidos (VARNAM e EVANS, 1991; FANTASIA e FILETICI, 1994). Apesar da existência de sistemas de notificação de doenças alimentares nos países citados, além de Japão e Canadá, sabe-se que os dados existentes não retratam a totalidade de surtos com esta etiologia (NOTERMANS e BORGDORFF, 1997). No Brasil, especificamente em São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo (CVE/SES-SP), foram notificados 27 surtos de *Salmonella* com 602 casos, correspondendo a 13,7% e 12,2%, respectivamente, do total de surtos e casos notificados de Doenças Transmitidas por Alimentos no ano de 2000 (Brasil 2002).

O problema das salmoneloses preocupa a Saúde Pública em nível internacional, pois *Salmonella* é uma bactéria com ampla distribuição geográfica, afetando também a importação e exportação de alimentos.

Apesar de *Salmonella* não possuir esporos e, portanto, apresentar termosensibilidade de células bacterianas vegetativas, além de outras características como incapacidade de sobreviver por longo tempo em pH ácidos, a ocorrência de surtos por *Salmonella* é freqüente. As causas são várias, em especial sua capacidade de disseminação, relacionada com possibilidades de contaminação cruzada em ambiente de preparo de alimentos, com conseqüente multiplicação, dependendo da temperatura e tempo decorrido entre preparo e consumo de alimentos (VARNAM e EVANS, 1991).

Métodos para o isolamento laboratorial de *Salmonella*

Enquanto amostras clínicas, como por exemplo, fezes, frequentemente contém concentrações elevadas de *Salmonella* e podem ser semeadas diretamente em meios altamente seletivos e diferenciais, isto não ocorre com amostras de alimentos, sendo necessário seguir-se esquemas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra (ZIPRIN, 1994).

Pré-enriquecimento corresponde a um período de crescimento em um caldo não seletivo como água peptonada tamponada ou caldo tripticase soja. O objetivo é favorecer a recuperação e multiplicação das bactérias viáveis presentes no alimento. Essa etapa é recomendada para alimentos que passaram por tratamentos que possam ter causado danos mas não a morte das células de *Salmonella*. Nesta situação, esta etapa permite que as células se recuperem e se multipliquem. Algumas vezes, o pré-enriquecimento permite diluir os inibidores de crescimento, como os aditivos ou outros componentes antimicrobianos presentes nos alimentos.

Enriquecimento seletivo é um processo no qual uma amostra contendo várias espécies bacterianas diferentes é cultivada em condições que favorecem o crescimento de um tipo particular de bactéria. Os caldos tetracionato, Rappaport-Vassiliadis e selenito-cistina são meios de enriquecimento seletivo para *Salmonella* (FLOWERS et al., 1992)

LE MINOR (1984) recomenda especificamente 3 meios de enriquecimento seletivo: o meio tetracionato de Muller, o caldo tetracionato de Muller modificado por Kauffmann, o qual contém bile e verde brilhante, e o caldo selenito-cistina de Leifson. Uma outra formulação de caldo de enriquecimento seletivo utilizada é o caldo Rappaport-Vassiliadis (VASSILIADIS et al, 1983, Van SCHOTHORST & RENAUD 1983), que usa verde malaquita e cloreto de magnésio como agentes seletivos, com maior sensibilidade que o tetracionato verde brilhante de Muller-Kauffmann.

Na etapa seguinte da pesquisa de *Salmonella* em alimentos os caldos de enriquecimento seletivo são estriados em placas contendo ágar seletivo-diferencial.

Caso colônias típicas de *Salmonella* sejam observadas após uma incubação de 18 a 24 h, é necessário examinar as suas características bioquímicas e sorológicas.

Os meios seletivos diferenciais utilizados para o isolamento de *Salmonella* são numerosos e incluem: ágar Xilose Lisina Deoxicolato (XLD), ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar Verde Brilhante (BGA), ágar Bismuto-Sulfito (BSA), ágar Hektoen-enterico (HE), ágar MacConkey, ágar Levine Eosina Azul de metileno (EMB), entre outros.

A confirmação bioquímica das colônias suspeitas de *Salmonella* nos meios seletivos diferenciais é feita pela inoculação de colônias selecionadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro, ágar Lisina Ferro e caldo uréia. Testes adicionais incluem fermentação de arabinose, utilização de citrato, fermentação de ramnose e de trealose, e outros.

A sorologia é realizada após a confirmação bioquímica, utilizando-se os antisoros polivalentes somático (O) e flagelar (H) para *Salmonella*. A reação de aglutinação frente aos antisoros é feita em lâmina ou placa de vidro.

Estes métodos têm sensibilidade para detectar uma célula viável de *Salmonella* por amostra analisada, mas a presença de outros microrganismos que podem competir com a *Salmonella* durante a etapa de enriquecimento podem impedir a sua detecção (BECKERS et al, 1987).

O aumento no número de casos de infecção por *Salmonella* tem consequências sociais e econômicas e evidenciam a necessidade de medidas preventivas (HUMPHREY, 1988; SOCKETT, 1991). Embora o controle da salmonelose requeira ações em todos os níveis da cadeia de produção de alimentos pela aplicação do sistema HACCP e do uso de Boas Práticas de Fabricação, a análise microbiológica de produtos envolvendo testes seguros com amostragens estatisticamente significantes e métodos analíticos sensíveis são também importantes (D' Aoust, 2001).

O isolamento de *Salmonella* por métodos convencionais necessita um período de pelo menos 5 dias para a obtenção de resultados positivos, e o trabalho laboratorial exigido pelas técnicas que envolvem as etapas de pré enriquecimento, enriquecimento seletivo, semeadura em placas, caracterização bioquímica e sorologia é grande (FLOWERS et al.,1992, ANDREWS et al.,1995).

Existe a necessidade da utilização de testes para detecção de *Salmonella* que propiciem resultados mais rápidos, com uma sensibilidade similar ou maior que a dos métodos convencionais.

Segundo FRANCO, 1999 os procedimentos alternativos para detectar e/ou isolar *Salmonella* de alimentos podem ser agrupados em 3 grandes grupos: I - Técnicas Imunológicas, II - Técnicas baseadas na quantificação do metabolismo e III - Técnicas moleculares

I - Técnicas Imunológicas:

I - a Técnicas imunoenzimáticas

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos existentes, o tipo não competitivo (tipo sanduíche) é o mais empregado nos sistemas de triagem de microrganismos patogênicos em alimentos. Neste tipo de método, os patógenos investigados, se presentes no produto em teste, são capturados por anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida, que dependendo do sistema, podem ser esferas de poliestireno, placas de microtitulação, partículas metálicas, papel e outras. Na etapa seguinte, o complexo antígeno-anticorpo formado reage com o conjugado, preparado através da ligação do anticorpo específico para o microrganismo a ser detectado e uma enzima cromogênica. As enzimas mais utilizadas nesses testes são a fosfatase alcalina e peroxidase. Em seguida o sanduíche formado reage com o substrato da enzima cromogênica, resultando em desenvolvimento de cor. Substratos fluorogênicos também podem ser empregados.

Os testes imunoenzimáticos para detecção rápida de *Salmonella* são muito empregados por apresentarem diversas vantagens: simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem. Em princípio, é possível produzir anticorpos específicos para qualquer sorotipo de *Salmonella*.

Atualmente, existe no mercado mundial um número bastante grande de sistemas comerciais baseados em técnicas imunoenzimáticas, grande parte deles disponível também no mercado brasileiro.

I - b Técnicas de imunocaptura

Nessas técnicas, as células de *Salmonella* são removidas da suspensão em teste através da captura por anticorpos específicos presentes na superfície de uma fase sólida. A fase sólida mais utilizada é composta por partículas metálicas, razão pela qual essas técnicas são também conhecidas pela denominação de técnicas de imunoseparação magnética. Uma vez obtida a ligação entre antígenos bacterianos e anticorpos, o sistema é então colocado em um suporte que contém um ímã que atrai as partículas metálicas. O material não ligado é removido usando uma pipeta, restando um concentrado de *Salmonella*. Esse material concentrado pode então ser utilizado para novo enriquecimento ou para semeadura em placas, que ficam muito mais eficientes pois a microbiota acompanhante de interferência foi, em grande parte, removida. Esta técnica, quando aplicada diretamente nos alimentos, pode reduzir ou mesmo substituir a etapa de pré-enriquecimento sempre necessária quando se pretende investigar a presença de *Salmonella* em alimentos pelos métodos convencionais.

I - c Técnicas de imunoimobilização

Nessa técnica, as salmonelas móveis cultivadas em meio semi-sólido tem sua mobilidade bloqueada pela adição de anticorpos flagelares específicos.

Há formação de uma banda de precipitação visível na interface anticorpo/bactéria. Essa técnica constitui a base de um sistema comercial bastante utilizado em diversos países para pesquisa de *Salmonella*. Esse sistema constitui-se em um conjunto de duas pequenas câmaras plásticas interligadas formando um L. A câmara horizontal contém um caldo de enriquecimento seletivo para *Salmonella* e a câmara vertical contém um meio semi-sólido, na superfície do qual se adiciona antisoro flagelar polivalente.

Se o alimento estiver contaminado com *Salmonella*, haverá em 24 horas a formação de uma banda de imunoprecipitação em forma de U no alto da câmara vertical. Esse teste é também um método de triagem, devendo toda a amostra positiva ser submetida aos testes convencionais para pesquisa de *Salmonella* em alimentos.

I - d Técnicas de aglutinação de látex

Essas técnicas são baseadas na aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos para *Salmonella*.

II - Quantificação do Metabolismo

II - a Condutância

As técnicas de Impedância-condutância são baseadas na propriedade que os microrganismos tem de alterar a transmissão da corrente elétrica através de um meio de cultura. Essas alterações ocorrem como consequência da mudança da composição química desse meio devido à atividade metabólica dos microrganismos presentes. Durante a multiplicação microbiana, moléculas grandes (proteínas, lipídeos, carboidratos) são transformadas em moléculas menores (aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos), quimicamente mais ativas. A formação e acúmulo desses metabólitos finais resultam em alterações mensuráveis na condutância e na impedância elétrica do meio. Existem no mercado vários aparelhos que fazem essas determinações, inclusive de *Salmonella*, empregando meios de cultura específicos e seletivos para esses microrganismos.

II - b Radiometria

É baseado na produção do $^{14}\text{CO}_2$ a partir de um substrato marcado com ^{14}C , como resultado do metabolismo bacteriano. STEWART et al., 1980, usaram esta metodologia para verificar a inibição específica da fermentação de ^{14}C dulcitol na presença de antisoro polivalente H. Após um enriquecimento seletivo, as culturas foram inoculadas em duplicata no meio de dulcitol, um contendo soro anti-salmonela. Uma grande redução da liberação de $^{14}\text{CO}_2$ devido a presença do antisoro era indicativa da presença de salmonela. Em 58 amostras de alimentos testadas houve uma concordância geral de 91% entre os resultados de positividade obtidos pela radiometria e o método convencional de cultura. Os autores verificaram que esse método era de simples realização e o custo por amostra era comparável com o método convencional de cultura. Quando culturas puras eram usadas para determinar a especificidade da técnica, verificou-se que 50% das enterobactérias davam resultados falso positivos enquanto cepas de *S. arizonae* deram resultados falso negativo (KONING et al., 1982; STEWART et al., 1980).

III - Técnicas Moleculares

Entre as técnicas baseadas em biologia molecular, as mais conhecidas são aquelas fundamentadas em reações de hibridização DNA/DNA ou DNA/RNA, e de PCR (reação de polimerase em cadeia).

III - a Hibridização

Para usar as técnicas de hibridização, é necessário submeter o microrganismo a um tratamento em que seu material genético é liberado da célula e separado em duas fitas simples. Em seguida adiciona-se as "sondas", que são fragmentos específicos de DNA ou RNA para o patógeno investigado. Essas sondas são marcadas com enzimas, normalmente cromogênicas. Quando há hibridização com a sonda, há desenvolvimento de cor, e portanto, a presença do microrganismo investigado é detectada.

Em estudos de validação para alimentos, o método DNA hibridização tem demonstrado ser tão efetivo quanto o método de cultura convencional (CURIALE et al., 1990^a; MOZOLA et al., 1991) e ser mais sensível do que o mesmo para produtos cárneos e aves (ROSE et al., 1991).

III - b PCR

A técnica de PCR é muito utilizada em microbiologia para amplificação do material genético de microrganismos.

Com o surgimento de vários "kits" comerciais, que tornaram essa técnica mais acessível, ela deixou de ser empregada somente em laboratórios de pesquisa para ser utilizada atualmente em laboratórios de controle de qualidade.

Os "kits" contém todos os reagentes necessários. A reação de amplificação é feita em tubos, e posteriormente realiza-se uma eletroforese para verificação da identidade das bandas de DNA obtidas, utilizando-se os padrões adequados (FRANCO, 1999).

Aplicação dos métodos rápidos de detecção de *Salmonella*

De todos os métodos rápidos anteriormente citados, os baseados em reações antígeno-anticorpo são os mais utilizados como métodos de triagem de amostras de alimentos positivas ou negativas para *Salmonella*. Isso se deve à sua maior simplicidade de utilização e ao seu menor custo, quando comparados aos demais métodos rápidos disponíveis (FRANCO, 1999).

Dos testes imunoenzimáticos comercializados no Brasil, os “kits” TECRA™ *Salmonella* VIA e TECRA™ *Salmonella* UNIQUE, fabricados pela TECRA Diagnostics, Roseville, NSW, Austrália, e comercializados no país pela Madasa do Brasil Ltda., são os mais conhecidos.

O “kit” TECRA™ *Salmonella* VIA é um teste imunoenzimático com enzima ligada, na configuração sanduíche. Anticorpos específicos, com alta afinidade para *Salmonella*, revestem a superfície das placas “Removawell” que acompanham o “kit”. Os antígenos de *Salmonella* quando presentes na amostra são capturados por esses anticorpos. Na etapa seguinte de lavagem, todos os materiais da amostra não capturados são retirados. Em seguida, adiciona-se um conjugado (anticorpos específicos para *Salmonella* marcados com enzima cromogênica) formando-se um sanduíche. A presença de *Salmonella* é indicada pelo desenvolvimento de cor verde, decorrente da ação da enzima do sanduíche sobre o substrato. A ausência de cor verde indica reação negativa para *Salmonella*.

O “kit” TECRA™ *Salmonella* UNIQUE combina, em um único módulo plástico, imunoenriquecimento com imunoensaio, utilizando como base fixa um bastão recoberto com anticorpos policlonais específicos para *Salmonella* móveis e imóveis. Todos os reagentes do teste vem previamente distribuídos nos tubos que formam o “kit”.

Apesar da utilização desses “kits” comerciais ser aprovada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), o mercado brasileiro necessita de dados locais sobre a sua eficiência e conveniência de uso, necessários para embasar sua utilização de forma rotineira no país.

2 - OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho dos imunoensaios rápidos TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE na detecção de *Salmonella* em 200 amostras de alimentos de origem animal, comparando os resultados com aqueles obtidos através do método convencional de cultura empregado na seção de Microbiologia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, da Secretaria de Estado da Saúde.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras para análise

Foram analisadas duzentas amostras de alimentos crus de origem animal, parte das quais enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise microbiológica e parte adquirida em feiras livres da cidade de São Paulo Capital. As amostras foram as seguintes:

Carne bovina: 23, carne suína: 1, linguiça crua: 18, tripa bovina: 12, ostra: 4, kibe cru: 1, hambúrguer cru: 3, carcaça de frango: 10, peixe: 7, salsicha: 3, peito de frango: 10, moela de frango: 10, asa de peru: 1, asa de frango: 4, pés de galinha: 1, fígado de frango: 9, coração de frango: 11, coxa e ante coxa de frango: 4, estômago bovino e suíno (dobradinha): 11, cabeça e pescoço de frango: 4, vísceras bovina (rim, pulmão, fígado, baço): 26, vísceras suína (fígado, rim): 4, língua de boi: 3, língua de suíno: 2, coração de suíno: 5, coração de boi: 4, sangue de suíno: 2, rabo de boi: 2, costela de cabrito: 1, toucinho: 2, banha de carneiro: 1, presunto cru: 1.

As amostras foram transportadas e mantidas sob refrigeração até serem analisadas (aproximadamente uma a duas horas após a chegada ao laboratório).

3.2. Análises microbiológicas:

As análises foram realizadas utilizando-se simultaneamente o método convencional de cultura, e os sistemas rápidos TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE, ambos da TECRA Diagnostics, Roseville NSW, Australia. Os “kits” TECRA foram empregados de acordo com as recomendações do fabricante, descritas em 3.2.2 e 3.2.3.

O método convencional de cultura empregado foi aquele utilizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, descrito em 3.2.1.

3.2.1 Metodologia convencional de cultura

A metodologia utilizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz para a detecção de *Salmonella* em alimentos compreende as seguintes etapas:

Pré-enriquecimento: 25 g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de APT (água peptonada tamponada a 1%) empregando-se um homogeneizador de pistão (stomacher 400 “Seward”, Londres). A mistura foi incubada a 35°C por 18 a 24 horas.

Para as carcaças de frango, foi utilizado enxágue das aves com 225 ml de água peptonada tamponada a 1%, incubada a 35° C por 18 a 24 horas.

Enriquecimento seletivo: 1,5 ml do caldo de pré-enriquecimento foi transferido para tubo contendo 20 ml de caldo selenito-cistina (SC), formulado, com incubação a 35°C por 48 h. 0,1 ml do caldo de pré-enriquecimento foi transferido também para 9,9 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid CM 669), distribuído em tubos de ensaio de 16x160 mm com incubação a 42°C por 48 horas.

A formulação do meio selenito-cistina é a seguinte: 5g de triptona, 4g de lactose, 10g de Na₂HPO₄, 4g de selenito de sódio, 1000 ml de água destilada, 100 ml de solução de cistina 1% estéril. Solução de cistina a 1% (1g de cistina, 80 ml de água destilada, 20 ml de NaOH 1N filtrados em membrana esterilizada de 0,22 µ de diâmetro).

Semeadura em meios seletivos: os caldos de enriquecimento seletivo SC e RV foram estriados na superfície de placas contendo ágar sulfito de bismuto segundo Wilson-Blair (BSA) (Merck 105418), ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Diagnostics Pasteur 64514) e ágar verde brilhante (BG) (Merck 107232). As placas de ágar SS e BG foram incubadas a 35°C por 18-24h e as de ágar BSA a 35°C por 48h.

Caracterização presuntiva das colônias suspeitas de *Salmonella*:

Foram consideradas colônias suspeitas de *Salmonella* aquelas que apresentaram as seguintes características:

ágar BSA: colônias pretas ou marrons, com ou sem brilho metálico, com halo escuro ao redor;

ágar SS: colônias pequenas, incolores, transparentes e com ou sem centro negro;

ágar BG: colônias rosa pálido, transparentes, com halo vermelho;

Colônias com essas características foram transferidas com agulha de níquel cromo para tubos contendo o meio de IAL (PESSÔA e SILVA, 1972 e 1974) e incubadas a 35°C por 18 a 24h. Foram consideradas colônias presuntivas de *Salmonella* as que apresentaram as seguintes características bioquímicas nesse meio: reação positiva de descarboxilação de lisina, produção de H₂S, reação negativa de indol, fermentação de glicose, com ou sem produção de gás e sacarose negativa.

Soroaglutinação e testes bioquímicos :

As colônias que apresentaram reações características de *Salmonella* no meio de IAL foram testadas frente aos antisoros polivalentes "O" e "H", através do teste de soroaglutinação em lâmina, empregando-se antisoros polivalentes flagelar (H) e somático (O) produzidos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz , São Paulo, SP.

Caracterizadas como *Salmonella*, as cepas foram enviadas para o Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. onde foram sorotipadas segundo metodologia descrita por POPOFF e LE MINOR, 1997.

Interpretação de Resultados

Somente as amostras nas quais a presença de *Salmonella* foi confirmada pela sorotipagem completa foram consideradas positivas.

3.2.2 TECRA Salmonella VIA

a) Materiais e reagentes:

O “kit” TECRA Salmonella VIA é composto pelos seguintes reagentes: dispositivos plásticos (Removawell) contendo poços cujo fundo é revestido com os anticorpos anti-*Salmonella*, solução concentrada de lavagem, controle positivo, diluente do controle, conjugado, diluente do conjugado, substrato, diluente do substrato, solução “stop”, suporte para os dispositivos plásticos, manual de instruções e cartão de cor, conforme indicado na Fig. 1.

Figura 1: Foto do “kit” TECRA Salmonella VIA

b) Preparação dos materiais e reagentes:

A preparação dos reagentes foi feita de acordo com a orientação do fabricante.

- **Solução de Lavagem:** A solução concentrada de lavagem foi diluída em 2 litros de água destilada ou deionizada e estocada a 4°C. Para a sua utilização empregou-se uma garrafa plástica com bico dispensador (pisseta).
- **Controle Positivo:** O controle positivo foi diluído com 3 ml do diluente do controle que acompanha o “kit”.
- **Controle Negativo:** O diluente restante da reconstituição do controle positivo foi usado como controle negativo.
- **Conjugado:** Cada “kit” contém dois frascos de conjugado e dois de diluente para o conjugado. O conteúdo de um dos frascos de diluente foi adicionado ao frasco do conjugado, mantendo a mistura em repouso em temperatura ambiente até completa dissolução (o conteúdo do frasco não deve ser agitado). A data de reconstituição foi registrada no rótulo, sendo 1 mês o prazo de utilização após a reconstituição.
- **Substrato:** O substrato foi reconstituído com o diluente correspondente, assegurando-se que o conteúdo tenha se dissolvido completamente. O substrato reconstituído deve apresentar coloração verde clara.
- **A Solução Stop** já vem pronta pronta para o uso.

Para o uso, todos os componentes do “Kit” estavam em temperatura ambiente (20 a 25° C).

c) Realização do teste

O imunoensaio foi realizado seguindo-se o protocolo de procedimentos descrito no manual de métodos, indicado para alimentos crus com alta carga de microrganismos (protocolo MS 2296 1/99 do TECRA Salmonella VIA). Foram realizadas as seguintes etapas:

- Pré-enriquecimento: 25g da amostra foram homogeneizadas com 225ml de água peptonada tamponada a 1%, utilizando-se um homogeneizador de pistão. A mistura foi incubada a 35-37° C por 18 a 22 horas.
- Enriquecimento seletivo: 0,1ml do caldo de pré enriquecimento foi transferido para um tubo contendo 9,9ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubado a 42°C por 16 a 20 horas.
- Pós-enriquecimento: 1ml do caldo Rappaport-Vassiliadis foi transferido para tubo contendo 10ml de caldo M e incubado a 35-37°C por 6 a 8 horas.

Aqueceu-se 1ml da cultura do caldo M por 15 minutos em um banho de água fervente, esfriando-se em seguida à temperatura ambiente. O restante do caldo M (não aquecido), bem como as culturas de enriquecimento seletivo, foram refrigeradas para serem usadas posteriormente para a confirmação dos resultados positivos obtidos no “kit”, através dos procedimentos da metodologia convencional de cultura.

Os dispositivos plásticos contendo os poços revestidos de anticorpos foram removidos do envelope lacrado, tomando-se um poço para cada amostra, um para o controle positivo e um para o controle negativo. Os dispositivos foram pressionados firmemente no suporte que acompanha o “kit”.

Utilizando-se uma pipeta automática, pipetou-se alíquotas de 200 µl dos controles positivo e negativo e das amostras no Caldo-M em poços individuais, anotando-se a posição de cada amostra em uma folha de registro. A placa foi coberta com um filme plástico e incubada por 30 minutos a 35-37°C.

Em seguida os poços foram esvaziados e submetidos a três lavagens consecutivas, com a solução de lavagem.

O líquido residual foi removido por inversão da placa, com absorção do líquido em papel toalha.

Em seguida adicionou-se a cada poço 200 µl do conjugado, e cobriu-se a placa com filme plástico, que foi incubada por 30 minutos a 35-37°C.

Os poços foram esvaziados e lavados 4 vezes, usando a sequência já descrita.

A cada poço foram adicionados 200 µl de Substrato, incubando-se a 20-25°C (temperatura ambiente) por 10 minutos.

Os poços foram levemente agitados antes de se proceder a leitura dos resultados.

A solução Stop não foi utilizada pois ela só é necessária quando a placa não pode ser lida imediatamente.

d) Leitura e Interpretação dos resultados:

O desenvolvimento de cor verde foi observada visualmente, comparando-se com o cartão de cor de referência, onde os painéis 1 (branco) e 2 (verde claríssimo) indicam resultado negativo e os painéis 3, 4 e 5, com intensidades crescentes da cor verde, indicam resultados presuntivos positivos (Figura 2).

Figura 2: Foto do cartão comparativo de cores do “kit” TECRA Salmonella VIA

Seguindo as instruções do fabricante, todos os resultados presuntivos positivos foram confirmados por estriamento do Caldo M não aquecido na superfície de placas com ágar seletivos SS, BG e BSA. Após a incubação, as colônias suspeitas de *Salmonella* foram confirmadas através de testes bioquímicos, sorológicos e sorotipagem, conforme descrito em 3.2.1.

3.2.3 - TECRA Salmonella UNIQUE

a) Materiais e reagentes:

O “kit” TECRA Salmonella UNIQUE consiste de módulos plásticos formados por 6 tubos numerados e um bastão plástico. Os tubos de 1 a 6 contêm solução tampão, solução de lavagem, caldo de enriquecimento, conjugado, solução de lavagem e substrato, respectivamente. Os bastões recobertos com os anticorpos vem acondicionados em envelope lacrado. O “kit” contém ainda um manual de instruções, o cartão de cor de referência e tampas plásticas para fechar os tubos. A Fig. 3 mostra os componentes do “kit”.

Figura 3: Foto do “kit” TECRA Salmonella UNIQUE

b) Preparação dos materiais e reagentes:

Esse “kit” vem pronto para uso. O pré enriquecimento das amostras na análise foi feito em água peptonada tamponada modificada, preparada através da adição de 0,74g de Na_2HPO_4 (anidro), 0,32g de KH_2PO_4 e 12,5 ml de TECRA™ Supplement-MBPWSP250 à 212,5 ml de APT. Após a homogeneização, a solução foi autoclavada por 15 minutos a 120°C. Após o esfriamento do meio, adicionou-se 2,25 ml de solução de Imbentin AGS/35 (fornecido pela Madasa no Brasil Ltda.), autoclavada separadamente a 100°C por 15 minutos e armazenada abaixo de 10°C. No momento de uso, a solução foi levada à temperatura ambiente (20 a 25°C).

c) Realização do teste:

Os testes foram realizados conforme recomendação do fabricante para alimentos crus com alta carga microbiana seguindo o protocolo TECRA MS 2327 9/98. Antes do início do uso do “kit”, efetuou-se o pré enriquecimento, de 25 g da amostra em 225 ml de APT modificada. A homogeneização foi feita empregando-se um stomacher. A mistura foi incubada a 42°C por 16 a 20 horas.

Iniciou-se o teste transferindo-se 4ml dessa cultura ao tubo 1 do módulo. Um bastão foi inserido neste tubo, e o conjunto foi incubado a 35°C por 20 minutos. Nessa etapa, os anticorpos purificados de alta especificidade que revestem a superfície do bastão capturam seletivamente qualquer *Salmonella* presente no meio de enriquecimento.

O bastão foi então transferido para o tubo 2, fechando-se o tubo 1 com uma tampa plástica.

O módulo foi invertido para garantir um bom contato do conteúdo do tubo 2 com o bastão, evitando-se a formação de bolhas de ar.

O bastão foi então transferido para o tubo 3, que contém o caldo M, incubando-se o módulo a 35-37° C por 5 horas, correspondente ao período de replicação da *Salmonella* capturada no bastão.

Em seguida o bastão foi transferido para o tubo 4, que contém o conjugado, formado por uma enzima cromogênica ligada a um anticorpo específico para *Salmonella*. O módulo foi incubado a 35-37° C por 30 minutos.

No passo seguinte, o bastão foi transferido para o tubo 5, que contém a solução de lavagem. Foram feitas 2 inversões do módulo para remover o excesso de conjugado.

Finalmente, o bastão foi transferido para o tubo 6, que contém o substrato da enzima do conjugado. O módulo foi incubado a 20-25° C ou à temperatura ambiente por 10 minutos.

d) Interpretação dos resultados:

O desenvolvimento de cor púrpura/cinza na metade inferior do bastão, após ser removido do tubo 6, foi considerado um resultado presuntivo positivo. A metade superior do bastão correspondente ao controle negativo do teste, deve permanecer branca.

Na extremidade do bastão deve apresentar coloração roxa, pois trata-se do controle positivo (Figura 4).

Figura 4: Foto do bastão do “kit” TECRA Salmonella UNIQUE

Os resultados presuntivos positivos foram confirmados por estriamento do caldo do tubo 3 (Caldo M) na superfície de placas de agar SS, BG e BSA. As etapas subsequentes seguiram a metodologia convencional de cultura, descrita em 3.2.1.

O fluxograma na figura 5 indica, de modo esquemático, cada uma das etapas de cada um dos três métodos empregados no trabalho.

Figura 5: Fluxograma descritivo das etapas empregadas nos três métodos de detecção de *Salmonella*.

3.3 Avaliação dos resultados

Somente as amostras de alimentos nas quais a presença de *Salmonella* foi confirmada através da sorotipagem completa foram consideradas positivas. Aquelas amostras em que *Salmonella* não pode ser detectada por nenhum dos três métodos foram consideradas negativas.

Um resultado falso negativo correspondeu à amostra que apresentou um resultado negativo por um dos métodos, mas foi confirmado positivo por pelo menos um dos outros dois métodos utilizados.

Denominou-se como resultado “presuntivo” aquele obtido antes da etapa de confirmação.

O teste de χ^2 de Mc Nemar com 5% de nível de significância, foi utilizado para determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre as proporções de resultados positivos confirmados e negativos obtidos por cada um dos métodos utilizados com o método convencional de cultura.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 200 amostras analisadas, 45 (22,5%) foram positivas para *Salmonella* por algum dos três métodos utilizados. Os sorotipos encontrados nessas amostras estão apresentados na Tabela 1. Verifica-se que houve predominância de *S. Enteritidis*, isolada de 13 (28,8%) amostras, seguida por *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Infantis*, isoladas de seis (13,3%) amostras cada uma. Uma das cepas de *Salmonella* não pôde ser sorotipada, por estar na forma rugosa.

Tabela 1: Sorotipos de *Salmonella* detectados nas amostras de alimentos

sorotipos	número de amostras
<i>S. Enteritidis</i>	13
<i>S. Typhimurium</i>	6
<i>S. Agona</i>	6
<i>S. Infantis</i>	6
<i>S. Hadar</i>	3
<i>S. Minnesota</i>	2
<i>S. Give</i>	2
<i>S. Saintpaul</i>	2
<i>S. Brandenburg</i>	1
<i>S. Cerro</i>	1
<i>S. London</i>	1
<i>S. IV 43:Z4,Z24:-</i>	1
não tipável (rugosa)	1
TOTAL	45

Das 45 amostras confirmadamente positivas para *Salmonella*, 34 (75,6%) foram detectadas pelo método convencional, 29 (64,4%) pelo sistema TECRA *Salmonella* VIA e 27 (60%) pelo sistema TECRA *Salmonella* UNIQUE.

O número total de amostras com resultado presuntivo positivo para *Salmonella* empregando o sistema TECRA Salmonella VIA foi 43. Entre essas amostras, 29 (67,4%) foram confirmadas como *Salmonella* positivas e os demais resultados (32,6%) foram considerados resultados falso-positivos pois não puderam ser confirmados através da metodologia empregada (Tabela 2).

Tabela 2: Desempenho dos procedimentos de cultura convencional, TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE na detecção de *Salmonella* em 45 amostras positivas de alimentos

Resultados	Cultura convencional		TECRA Salmonella VIA		TECRA Salmonella UNIQUE	
	n	%	n	%	n	%
Positivo presuntivo	n.a. ^a	n.a.	43	95,5	47	104,4
Positivo confirmado	34	75,6	29	64,4 ^b 67,4 ^c	27	60,0 ^b 57,4 ^c
Positivo presuntivo não confirmado	n.a.	n.a.	14	32,6	20	42,6
Falso negativo ^d	11	24,4	16	35,6	18	40

n= número de amostras analisadas

^a = não aplicável

^b = em relação ao número total de amostras positivas

^c = em relação ao número de amostras presuntivas positivas pelo método em questão

^d = número de amostras positivas não detectadas pelo método em questão

A Tabela 3 mostra a relação existente entre os resultados positivos confirmados e resultados negativos obtidos pelo sistema TECRA Salmonella VIA e pelo método convencional de cultura. Conforme apresentado, entre as amostras confirmadamente positivas para *Salmonella* pelo sistema TECRA Salmonella VIA, 4 foram positivas somente por esse sistema, não sendo detectadas pelo método convencional de cultura. Dessa forma, as quatro amostras não detectadas pelo método convencional correspondem à 13,8% das amostras confirmadamente positivas pelo sistema TECRA Salmonella VIA.

Por outro lado, o sistema TECRA Salmonella VIA não deu resultado positivo em 9 amostras positivas pelo método convencional de cultura. Assim, a porcentagem de resultados falso-negativos para esse sistema foi de 26,5% em relação ao sistema convencional e 35,6% em relação ao número total de amostras positivas para *Salmonella*.

Tabela 3: Número de amostras positivas confirmadas e negativas para *Salmonella* pelo método convencional e pelo sistema TECRA Salmonella VIA.

TECRA VIA (conf)	mét.convencional		Total
	+	-	
+	25	4	29
-	9	162	171
Total	34	166	200

Considerando resultados positivos confirmados e resultados negativos em conjunto, verificou-se pelo teste de McNemar que as diferenças entre os resultados obtidos pelo sistema TECRA Salmonella VIA, quando comparados aos obtidos pelo método convencional de cultura, não foram significativas, ao nível de 5% ($p = 0,267$).

O número total de amostras com resultado presuntivo positivo para *Salmonella* empregando o sistema TECRA Salmonella UNIQUE foi 47. Entre essas amostras, 27 (57,4%) foram confirmadas como *Salmonella* positivas e os demais resultados (42,5%) foram considerados resultados falso-positivos pois não puderam ser confirmados através da metodologia empregada (Tabela 2).

A Tabela 4 mostra a relação existente entre os resultados positivos confirmados e resultados negativos obtidos pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE e pelo método convencional de cultura. Conforme apresentado, entre as amostras confirmadamente positivas para *Salmonella* pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE, 10 foram positivas somente por esse sistema, não sendo detectadas pelo método convencional de cultura. Dessa forma, o método convencional deixou de detectar 37,0% das amostras confirmadamente positivas pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE.

Por outro lado, o sistema TECRA Salmonella UNIQUE não foi eficiente na detecção de 17 amostras positivas pelo método convencional de cultura. Dessa forma, a porcentagem de resultados falso-negativos para esse sistema foi 50% em relação aos resultados do sistema convencional e 40% em relação ao total de amostras positivas para *Salmonella*.

Tabela 4: Número de amostras positivas confirmadas e negativas para *Salmonella* pelo método convencional e pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE

	mét. convencional		Total
	+	-	
TECRA UNIQUE(conf)			
+	17	10	27
-	17	156	173
Total	34	166	200

Considerando resultados positivos confirmados e resultados negativos em conjunto, verificou-se pelo teste de McNemar que as diferenças entre os resultados obtidos pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE, quando comparados aos obtidos pelo método convencional de cultura não foram significativas, ao nível de 5% ($p = 0,248$).

Uma avaliação comparando um sistema rápido com o outro (Tabela 5) permite verificar que das 45 amostras positivas para *Salmonella* 17 (37,7%) deram resultado positivo confirmado pelos dois sistemas rápidos simultaneamente. Doze amostras positivas pelo sistema TECRA Salmonella VIA foram negativas pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE, ao passo que 10 amostras positivas pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE foram negativas pelo sistema TECRA Salmonella VIA.

Tabela 5: Número de amostras positivas e negativas para *Salmonella* pelo sistema TECRA Salmonella UNIQUE e pelo sistema TECRA Salmonella VIA

	TECRA UNIQUE(conf)		Total
	+	-	
TECRA VIA (conf)			
+	17	12	29
-	10	161	171
Total	27	173	200

A Tabela 6 mostra a concordância entre os resultados confirmados positivos e resultados negativos obtidos para as 200 amostras de alimentos analisados, quando os três métodos de análise são considerados em conjunto. Conforme é possível verificar, quatro (8,8%) das amostras analisadas apresentaram resultado positivo para *Salmonella* exclusivamente pelo método convencional. Nenhum dos outros dois métodos foi capaz de detectar o patógeno nessas amostras.

Os alimentos e os respectivos sorotipos de *Salmonella* isolados pelo método convencional foram:

- pulmão de boi e língua de suíno: (S. Infantis);
- miúdos de porco: (S.IV 43: Z₄,Z₂₄-);
- moela de frango: (S. Enteritidis)

Por outro lado, o sistema TECRA Salmonella UNIQUE detectou sete (15,5%) amostras positivas que não haviam sido detectadas por nenhum dos outros dois métodos. Os alimentos implicados e os sorotipos foram:

- tripas de boi: (S. Cerro);
- fígado de boi: (S. Saintpaul);
- 2 carcaças de frango: (S. Enteritidis);
- pulmão de boi: (S. Typhimurium);
- fígado de frango: (S. Enteritidis);
- moela de frango: (S. Enteritidis).

O sistema TECRA Salmonella VIA. detectou apenas uma (2,2%) amostra positiva que não foi positiva por nenhum dos outros métodos. Essa amostra foi coração de frango e o sorotipo isolado foi S. Give.

Tabela 6: Positividade para *Salmonella* em alimentos crus de origem animal, de acordo com o método analítico.

RESULTADOS	n	%
Positivos para <i>Salmonella</i> em pelo menos um dos três métodos	45	100
Positivos para o procedimento de cultura convencional exclusivamente	4	8,8
Positivos presuntivo pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA exclusivamente	6	13,3
Positivos confirmado pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA exclusivamente	1	2,2
Positivos presuntivo pelo TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE exclusivamente	10	22,2
Positivos confirmado pelo TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE exclusivamente	7	15,5
Positivos pelo procedimento de cultura convencional e presuntivo positivos TECRA <i>Salmonella</i> VIA simultaneamente	26	57,8
Positivos pelo procedimento de cultura convencional e confirmado positivo pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA simultaneamente	25	55,6
Positivos pelo procedimento de cultura convencional e presuntivo positivo TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE simultaneamente	24	53,3
Positivos pelo procedimento de cultura convencional e confirmado positivo TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE simultaneamente	17	37,8
Positivos confirmados pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA e TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE simultaneamente	17	37,8
Positivos pelo procedimento de cultura conven., presuntivo positivo pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA e pelo TECRA Sal. UNIQUE simult.	20	44,4
Positivos pelo procedimento de cultura conven., confirmado positivo pelo TECRA <i>Salmonella</i> VIA e pelo TECRA Sal. UNIQUE simult.	14	31,1

Os resultados obtidos neste estudo reforçam os resultados reportados anteriormente em outras avaliações, embora poucos estudos tenham sido publicados a respeito do desempenho dos sistemas TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE. O primeiro estudo data de 1988, no qual foi avaliada a eficiência de um sistema denominado TECRA Salmonella Visual Immunoassay, que corresponde ao precursor do atual sistema TECRA Salmonella VIA (FLOWERS et al, 1988). Nesse estudo, os autores analisaram um número grande de amostras, naturalmente e experimentalmente contaminados com *Salmonella*. Os resultados mostraram que, embora os resultados de positividade tenham sido ligeiramente diferentes, o método novo foi tão eficiente quanto o método convencional de cultura para detecção de *Salmonella*. O índice de concordância entre os resultados foi de 96,7%. Tendo esses resultados como ponto de referência, o sistema TECRA Salmonella VIA foi recomendado para receber a classificação "Official AOAC First Action". A aprovação final ("Official AOAC Final Action") foi obtida em 1991, e atualmente esse sistema corresponde ao Método Oficial AOAC 989.14 (AOAC, 2000).

Em um novo estudo realizado com o TECRA Salmonella Visual Immunoassay, no qual empregou-se água peptonada tamponada para o pré enriquecimento e substituiu-se o caldo Selenito Cistina por caldo Rappaport-Vassiliadis incubado a 42° C para o enriquecimento seletivo, o desempenho do sistema foi melhorado. Esse dado foi observado na comparação entre os dois caldos de enriquecimento seletivo, quanto a incidência de resultados positivos e negativos. O caldo Rappaport-Vassiliadis não apresentou nenhum resultado falso negativo. Nesse estudo foram analisados somente alimentos naturalmente contaminados e o índice de concordância com os resultados obtidos através do método convencional de cultura foi 95% (LAMBIRI et al, 1990).

Em 1996, avaliou-se uma versão modificada do sistema TECRA Salmonella Visual Immunoassay, no qual os anticorpos originais foram suplementados com novos anticorpos policlonais para os sorotipos imóveis de *Salmonella* (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*) (HUGHES et al, 1996). Essa nova versão do sistema foi comparada ao imunoensaio original e aos métodos convencionais de cultura recomendados pela AOAC (Métodos 967.25 e 967.28), empregando caldo Rappaport Vassiliadis a 42° C na etapa de enriquecimento seletivo. O estudo foi realizado com trezentos sorotipos de *Salmonella*, com cepas não-*Salmonella* e alimentos experimentalmente inoculados com esses microrganismos. O novo TECRA Salmonella VIA apresentou um melhor desempenho que o sistema original, com sensibilidade e especificidade semelhantes. A capacidade de isolamento de *Salmonella* dos alimentos contaminados artificialmente não foi significativamente diferente daquela apresentada pelos métodos convencionais de cultura, e o novo sistema recebeu a classificação "AOAC Official First Action".

Em relação ao sistema TECRA™ Salmonella UNIQUE, JONES et al., 1995, compararam seu desempenho ao apresentado pelo método de cultura padrão britânico (Método BS 5763 – ISO 6579) para pesquisa de *Salmonella* em uma variedade de alimentos experimentalmente contaminados. Os autores observaram que esse sistema apresentava maior sensibilidade que outros imunoensaios comerciais, apresentando especificidade para detecção de todos os quarenta e dois sorotipos de *Salmonella* testados (JONES et al., 1995).

TECRA Salmonella UNIQUE foi também comparado ao método de cultura do FDA (Food and Drug Administration) para detecção de *Salmonella* em alimentos experimentalmente contaminados (laticínios, carnes, vegetais e pescado). O índice de concordância entre os resultados foi bom: para cada nível de inóculo, houve detecção de *Salmonella* em mais amostras utilizando o TECRA Salmonella UNIQUE do que o procedimento do FDA. Os autores enfatizaram a conveniência desse método rápido, onde os resultados estavam disponíveis em 24 horas, contrastando com as 96 horas necessárias para o método do FDA (FLINT e HARTLEY, 1993).

POPPE e DUNCAN, 1996, empregaram TECRA™ Salmonella UNIQUE e o meio Rappaport Vassiliadis Semi-sólido Modificado (MSRV) para testar cem amostras de carnes cruas de aves quanto à presença de *Salmonella*. A sensibilidade e especificidade do método rápido, quando comparado ao meio MSRV, foram 59,3% e 97,6%, respectivamente (POPPE e DUNCAN, 1996).

Em um estudo colaborativo mais recente, HUGHES e col., 2001 compararam o TECRA Salmonella UNIQUE com o método cultural de referência do Bacteriological Analytical Manual (BAM). Três tipos de alimentos (leite em pó, pimenta e farinha de soja) foram analisados na Austrália e 2 tipos de alimentos (achocolatado e ovo pasteurizado) nos Estados Unidos. Para cada tipo de alimento, foram feitos três níveis de inoculação. A comparação dos resultados não demonstrou diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na proporção de amostras positivas pelo teste UNIQUE e pelo método de cultura de referência, quando realizada a análise estatística pelo teste de χ^2 . Os autores recomendaram que o teste UNIQUE para detecção de *Salmonella* em alimentos fosse adotado como método oficial (HUGHES et.al., 2001).

Um aspecto importante a ser considerado é que o protocolo de teste empregado nesse estudo para avaliação do TECRA Salmonella VIA foi recentemente modificado pelo fabricante. Para a pesquisa de *Salmonella* em alimentos com elevada carga microbiana (carne, peixe, frango, etc.), passou-se a recomendar o emprego do caldo lactosado como meio de pré-enriquecimento e caldo Rappaport-Vassiliadis a 41-43 °C como meio de enriquecimento seletivo. É oportuno lembrar que nesse estudo foi empregado APT (água peptonada tamponada) como meio para pré-enriquecimento pois esse é o meio utilizado rotineiramente na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz para pesquisa de *Salmonella* em alimentos e era o indicado também no protocolo de análise. Outro ponto importante é que o novo protocolo de análise inclui a suplementação do caldo lactosado com Imbentin AGS/35 ou Triton X-100, o que não era preconizado ainda quando esse estudo foi desenvolvido. Essas modificações no protocolo de análise, caso tivessem sido implementadas, poderiam ter melhorado o desempenho desse sistema rápido.

Em relação ao TECRA Salmonella UNIQUE, há também um novo protocolo de teste, no qual a etapa de confirmação de um teste presuntivo positivo (bastões com cor púrpura) é diferente daquela executada nesse estudo. Ao invés de semear o caldo do tubo 3 diretamente em meios sólidos seletivos, o atual protocolo para alimentos com elevada carga microbiana recomenda que esse caldo seja transferido para um tubo com caldo Rappaport-Vassiliadis, antes da semeadura em placas seletivas. Esse procedimento diminui o excessivo crescimento dos microrganismos contaminantes nas placas com meios seletivos, aumentando a possibilidade de observação da presença de *Salmonella* nessas placas. É razoável concluir que esse detalhe melhora o desempenho da confirmação dos resultados positivos do sistema TECRA Salmonella UNIQUE, pois verificou-se no estudo grande frequência de resultados presuntivos positivos que não puderam ser confirmados pela metodologia de confirmação empregada.

Algumas vantagens interessantes dos sistemas TECRA Salmonella VIA e TECRA Salmonella UNIQUE foram observadas durante o desenvolvimento desse trabalho. A mais importante, com certeza, é a redução no tempo total de análise (Fig. 6). O sistema TECRA Salmonella VIA requer um tempo total de 42-52 horas, enquanto o TECRA Salmonella UNIQUE necessita de apenas 20-22 horas. Esses tempos contrastam com os três dias necessários para um resultado presuntivo pelo método convencional de cultura, que requer dois dias adicionais para um resultado positivo confirmado.

Outra vantagem observada para os dois sistemas avaliados é a sua simplicidade de execução. Nesse aspecto, o sistema TECRA Salmonella UNIQUE é mais conveniente que o TECRA Salmonella VIA, já que é um sistema pronto para uso, isto é, menos trabalhoso e menos sujeito a erros do analista.

Figura 6 Quadro comparativo do tempo necessário para o desenvolvimento do três métodos para detecção de *Salmonella* em alimentos

5 - CONCLUSÕES:

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, é possível chegar às seguintes conclusões:

1 - O desempenho dos três métodos (TECRA Salmonella VIA, TECRA Salmonella UNIQUE e método convencional de cultura) para a detecção de *Salmonella* foi similar. As diferenças no número de amostras positivas para *Salmonella* detectadas pelos dois imunoensaios rápidos, quando comparados ao método convencional utilizado no Instituto Adolfo Lutz, não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$).

2 - Os dois imunoensaios apresentam a vantagem da rapidez na obtenção de resultados, quando comparados com o método convencional de cultura. Para o TECRA Salmonella UNIQUE são necessários 20-22 horas e para o TECRA Salmonella VIA, 42-52 horas, enquanto para o método convencional utilizado no Instituto Adolfo Lutz são necessários pelo menos 5 dias.

3 - Pela facilidade de execução dos dois sistemas rápidos, economia de material de laboratório e pela confiabilidade dos resultados apresentados, os sistemas podem ser recomendados para triagem de amostras negativas para *Salmonella*. É importante ressaltar que as amostras presuntivas positivas necessitam ser confirmadas pela metodologia convencional de cultura.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDREWS, W.H., JUNE, G.A, SHERROD, P.S., HAMMACK, T.S., AMAGUANA, R.M. *Salmonella* In: United States FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1995. p. 5.01-5.20.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 17. ed. Arlington: AOAC, 2000. p. sec. 989.14.

BRASIL, 2002, ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc tec/ surto dta 00 ppt em 23/01/2002.

BEAN, N.H, GOULDING, J.S., DANIELS, M.T., ANGULO, F.J. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1988-1992: review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.10, p.1265-1286,.1997.

BECKERS, H.J., HEIDE, J.V.D., FENIGSEN-NARUCKA, U., PETERS, R. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.62, p.97-104, 1987.

D' Aoust, J.Y., MAURER, J., BAILEY, J.S. *Salmonella* Species In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. ASM Press Washington, D. C.2001 p.141-178.

* De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1997 [cd-room].

FANTASIA, M.R. FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italia. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.21, p.7-13,1994.

FLINT, S.H., HARTLEY, N.J. Evalution of the TECRA immunocapture ELISA for the detection of *Salmonella* typhimurium in foods. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.17, p.4-6, 1993.

FLOWERS, R.S., D'AOUST, J.Y., ANDREWS, W.H., BAILEY, J.S. "*Salmonella*". In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: APHA, American Public Health Association 1992. cap.25, p.371-422.

FLOWERS, R.S., KLATT, M.J. and KEELAN, S.L. Visual immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.71, n.5, p.972-980, 1988.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: Revisão. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.33, n.2, p. 229-234, 1999.

FRANCO, B.D.G.M, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 187 p.

HUGHES, D., DAILIANIS, A.E., HILL, L., McINTYRE, D.A., ANDERSON, A. TECRA Unique™ Test for rapid detection of *Salmonella* in food: collaborative study **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.84, p.416-429, 2001.

HUGHES, D., DAILIANIS, A., ASH, M. Comparison of modified Tecra Visual Immunoassay with AOAC method 989.14 and reference culture methods 967.25-967.28 for detection of *Salmonella* in foods and related samples. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v. 79, n.6, p.1344-1359, 1996.

HUMPHREY, T.J., MEAD, G.C. and ROWE, B. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.100, p.175-184, 1988.

JAY, J.M. Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella* In: **Modern Food Microbiology.**, 6.ed., Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers, 2000. p. 511-524.

JONES, K.L., MACPHEE, S.; TURNER, A., BETTS, R.P. An Evaluation of the Tecra Unique Salmonella Test for the detection of *Salmonella* from foods. Campden and Chorleywood Food Research Association R&D, 1995. p.1-15.report n.5 project n. 18140.

KONING, W., SMELT, J., VERRIPS, Th. Evaluation of a rapid detection method of Salmonella basedon the conversions of [^{14}C] dulcitol. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.48, p.408-411, 1982.

LAMBIRI, M., MAVRIDOU, A., RICHARDSON, S.C., PAPADAKIS, J.A.. Comparison of the TECRA Salmonella Immunoassay with the convencional culture method. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.11, p.182-184, 1990.

Le MINOR, L. Genus III *Salmonella*. In: STALEY, J.T, BRYANT, M.P. eds. **BERGEY'S manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v.1, p.427-458.

MOZOLA, M., HALBERT, D., CHAN, S., HSU, H.S., JOHNSON, A., KING, W.I., WILSON, S., BETTS, R.P., BANKES, P., BANKS, J.G. Detection of foodborne bacterial pathogens by a colorimetric DNA hybridization method. In: GRANGE, J.M., FOX, A., MORGAN, N.L., eds. **Immunological techniques in microbiology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1991. p.203-216

PESSÔA, G.V.A., SILVA, E.A.M. Milieu pour l'identification présumptive rapide des entérobactéries, des aeromonas et des vibrions. **Ann. Microbiol.** Inst. Pasteur, Paris, v.125 A, p.341-347, 1974.

PESSÔA, G.V.A., SILVA, E.A.M. Meios de rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.32, p.97-100, 1972.

POPOFF, M.Y., MINOR LE. Formule antigeniques des sérovars de *Salmonella*. Paris: Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherches pour les Salmonella, Institut Pasteur, 1997. p.151.

POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., BRENNER, F.W. and GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n° 44) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, Paris, v.152, p.907-909, 2001.

- POPPE, C, DUNCAN, C.L. Comparison of detection of *Salmonella* by the Tecra Unique Salmonella test and modified Rappaport Vassiliadis medium. **Food Microbiol**, Kent, v.13, p.75-81, 1996.
- PROST, E., RIEMANN, H. Food-borne salmonellosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.23, p.495-528, 1967.
- ROSE, B.E., LLABRÉS, C. M, BENNETT, B. Evaluation of a colorimetric DNA hybridization test for detection of salmonellae in meat and poultry products. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.54, p.127-130, 1991.
- SCHORTHORST, M., RENAUD, A.M. Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's Medium (R 10). **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.54, p.209-215, 1983.
- SOCKETT, P.N. The economic implications of human salmonella infection. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.71, p.289-295, 1991.
- STEWART, B.J., EYLES, M.J, MURREL, W.G. Rapid radiometric method for the detection of *Salmonella* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.40, p.223-230, 1980.
- VARNAM, A.H., EVANS, M.G. *Salmonella*. In: **Foodborne Pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book; London: Wolfe, 1991. c.4, p.51-85.
- VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.54, p.69-76, 1983.

ZIPRIN, Richard L. "*Salmonella*" In: HUI, Y.H., YIU, H., eds. **Foodborne disease handbook**. New York: Marcel Dekker, 1994. v.1, p.253-318.

Resumo

A presença de *Salmonella* em 200 amostras de alimentos crus de origem animal foi investigada empregando-se os dois ensaios imunoenzimáticos rápidos TECRA™ *Salmonella* VIA e TECRA™ *Salmonella* UNIQUE (TECRA Diagnostics, Roseville, NSW, Australia) e o método de cultura convencional empregado rotineiramente no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Quarenta e cinco amostras (22.5%) foram *Salmonella* positivas por pelo menos um dos três métodos. O número de amostras positivas de acordo com o método analítico foi 34 (75,6%) para o método de cultura convencional, 29 (64,4%) para TECRA™ *Salmonella* VIA e 27 (60.0%) para TECRA™ *Salmonella* UNIQUE. O método de cultura convencional detectou quatro amostras positivas não detectadas por nenhum dos outros dois métodos rápidos. TECRA™ *Salmonella* UNIQUE detectou sete amostras positivas não detectadas pelos demais métodos. Uma amostra foi positiva apenas pelo método TECRA™ *Salmonella* VIA. Considerando todos os resultados (positivos e negativos) o teste de qui quadrado de McNemar indicou que as diferenças entre os resultados obtidos pelos métodos rápidos, quando comparados aos obtidos pelo método convencional, não foram estatisticamente significativas ($p>0.05$).

**Detection of *Salmonella* in Raw Foods of Animal Origin Using Tecra™
Salmonella VIA and Tecra™ Salmonella UNIQUE Rapid Immunoassays
and a Cultural Procedure**

Abstract

The presence of *Salmonella* in 200 raw food samples of animal origin was investigated by means of rapid immunoassays TECRA™ Salmonella VIA and TECRA™ Salmonella UNIQUE (TECRA Diagnostics, Roseville, NSW, Australia) and the cultural procedure used routinely in Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Forty-five samples (22.5%) were *Salmonella* positive by at least one of the three methods. The number of positive samples according to the analytical method was 34 (75.6%) for the cultural procedure, 29 (64.4%) for TECRA™ Salmonella VIA and 27 (60.0%) for TECRA™ Salmonella UNIQUE.

The cultural method detected four positive samples that both rapid methods were unable to detect. TECRA™ Salmonella UNIQUE detected seven positive samples that were not detected by the two other methods. One sample was positive by the TECRA™ Salmonella VIA exclusively. Considering overall results (positive and negative) McNemar's chi square tests indicated that the differences between results given by the rapid immunoassays when compared to those of the cultural method were not significant ($p>0.05$).