Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

**MÉTODOS RAPIDOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS:
ESTUDO CRÍTICO E AVALIAÇÃO DE NOVAS METODOLOGIAS**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
para o Concurso de Livre-Docência junto ao
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental**

São Paulo

1994

Ao Antonio Carlos, à Nancy e à Cristina,
com todo meu carinho

Agradecimentos

Profa. Mariza Landgraf
Prof. Daniel Y.C. Fung
Prof. Franco Maria Lajolo
Profa. Marilene de Vuono Camargo Penteado
Prof. Jorge Mancini Filho
Profa. Maria Teresa Destro
Dra. Kinue Irino
Marta Benedita da Silva Santos
Elaine Cristina Pereira
Regina Batista dos Reis
Regina Kubota
Magda Aparecida de Assis
Lucia de Fátima Gomes da Silva
Moema Rodrigues dos Santos
pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do
FBA/FCF/USP
colegas do FBA/FCF/USP

FAPESP
CNPq
3M do Brasil Ltda.
BioControl Systems, Inc., WA, EUA.

Introdução geral.....	1
-----------------------	---

**Parte I: Estudo crítico dos métodos rápidos para
análise microbiológica de alimentos.**

Introdução	4
Técnicas envolvidas com o preparo do material necessário para uma análise microbiológica	6
Técnicas de microscopia	8
Métodos alternativos para contagem de microrganismos viáveis	11
Técnicas indiretas para enumeração de microrganismos viáveis	22
Técnicas genéticas	28
Técnicas imunológicas	34
Métodos miniaturizados para identificação de microrganismos	40
Perspectivas para o futuro	42
Resumo	44
Summary	44

**Parte II: Avaliação do sistema Petrifilm para enumeração
de microrganismos indicadores de higiene em
alimentos**

Introdução	45
Material e métodos	55
Resultados e Discussão	59
Resumo	81
Summary	81

**Parte III: Avaliação do kit *Salmonella* 1-2 Test para
pesquisa de salmonelas móveis em produtos
cárneos**

Introdução	83
Material e métodos	89
Resultados	95
Discussão	100
Resumo	106
Summary	106
Referências bibliográficas.....	108
Resumo	127
Summary.....	127

*Pensar o futuro atrai, desafia e engana.
E mudar o futuro depende de mudar
a maneira como se pensa o presente.
Herbert de Souza (1935 -).*

Introdução Geral

Independentemente da área em que atuam, os microbiologistas estão sempre interessados em novos métodos analíticos para a quantificação e identificação de microrganismos e/ou de seus produtos metabólicos. Têm interesse especial por aqueles que permitem obtenção mais rápida de resultados e por aqueles que permitem execução mais rápida das análises, se possível a custo menor que o dos métodos convencionais. Esses novos métodos, aqui chamados genericamente de MÉTODOS RAPIDOS, surgiram na década de 70 e hoje pode ser observada uma verdadeira explosão no número e na variedade de novas técnicas, de uso potencial em todas as áreas da microbiologia aplicada, inclusive alimentos.

O acentuado interesse dos microbiologistas de alimentos pelos métodos ditos rápidos pode ser explicado pela implantação, cada vez mais comum, de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nas indústrias de alimentos, inclusive no Brasil. Com esses programas, o controle de qualidade microbiológica de alimentos fica muito mais relacionado com o monitoramento e o controle de pontos críticos no processamento de alimentos do que com a análise microbiológica do produto final. Consequentemente, é imprescindível que respostas rápidas possam ser obtidas durante esse monitoramento para que medidas corretivas, quando necessárias, possam ser tomadas o mais rápido possível. Respostas rápidas são também necessárias para controle da eficiência da operação de APPCC implantada.

Esse trabalho pretende apresentar e discutir os MÉTODOS RÁPIDOS de interesse na área de microbiologia de alimentos, avaliando-os em relação aos métodos convencionais. Para isso, esse trabalho foi subdividido em três partes, a saber:

- Parte I: Estudo crítico dos métodos rápidos para análise microbiológica de alimentos.

Nessa parte do trabalho são apresentados os principais métodos rápidos para análise microbiológica de aplicação na área de alimentos, fazendo-se uma análise crítica de suas características e suas vantagens e desvantagens quando comparados aos métodos analíticos convencionais. É dada ênfase à contribuição representada pelos trabalhos de pesquisa nessa área desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP,

- Parte II: Avaliação do sistema Petrifilm para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em alimentos

Nessa parte do trabalho são apresentados resultados de um estudo conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, no qual se avaliou a técnica Petrifilm (3M do Brasil Ltda) para enumeração rápida de microrganismos indicadores de higiene em vários tipos de alimentos, comparando-a com as técnicas convencionais de plaqueamento.

- Parte III: Avaliação do kit *Salmonella* 1-2 Test para pesquisa de salmonelas móveis em produtos cárneos

Nessa parte do trabalho são apresentados resultados de um estudo conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

USP, no qual se avaliou a técnica de imunoimobilização *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., WA, Estados Unidos) para detecção rápida de salmonelas móveis em produtos cárneos de suíno, comparando-a com as técnicas convencionais de isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos.

Observação:

A citação de nomes de empresas e de produtos é desprovida de qualquer interesse comercial. Devido à impossibilidade de se citar todas as empresas e produtos relacionados aos assunto, selecionou-se apenas os mais relevantes ou aqueles disponíveis no mercado brasileiro.

Parte I

Estudo crítico dos métodos rápidos para análise microbiológica de alimentos.

Introdução

A avaliação da contaminação microbiana presente nos alimentos é assunto de interesse desde o início da bacteriologia como ciência. Os métodos utilizados nessa avaliação, que incluem técnicas para detecção, enumeração e identificação de micróbios, são descritos em livros chamados "de referência", sendo os mais importantes, no momento, o *Bacteriological Analytical Manual* (FDA/AOAC, 1992), o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992a), o *Official Methods of Analysis* (AOAC, 1990), o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (APHA, 1992b), o *Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration* (ICMSF, 1978), o *Official Methods of Microbiological Examination of Foods* (Minister of Supply and Services Canada, 1989) e o *Manual of Food Quality Control* (Andrews, 1992). Esses textos tem aceitação internacional, inclusive no Brasil.

Em relação a qualquer método novo, os métodos convencionais apresentam a grande vantagem de serem utilizados há longo tempo e de serem reconhecidos como oficiais, tanto nacional como internacionalmente. Por outro lado, tem várias desvantagens, sendo as mais evidentes aquelas relacionadas com o tempo longo para obtenção de resultados, com o volume de trabalho e com o tempo envolvido na sua execução, e com o custo em termos de vidraria e equipamentos de laboratório (incubadoras, geladeiras, autoclaves, fornos, contadores, etc.) necessários. Por essas razões, o campo de pesquisa em novos métodos está crescendo muito, tanto nos países desenvolvidos e ricos como naqueles com menos recursos.

Essa área de pesquisa iniciou seu desenvolvimento a partir dos anos 70. Em 1973 foi realizado o Primeiro Simposio Internacional em Métodos Rápidos e Automação em Microbiologia, em Estocolmo, na Suécia. Muitos outros simpósios e congressos internacionais aconteceram desde então, diversos livros nessa área vem sendo regularmente publicados e até um novo periódico, de circulação internacional, dedicado exclusivamente a esse assunto, existe desde 1992 (Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, Food and Nutrition Press, Inc., Trumbull, CT, Estados Unidos).

Nos Estados Unidos, a avaliação do uso de novos métodos em microbiologia de alimentos é feita pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) em conjunto com o FDA (Food and Drug Administration). Quando um método novo qualquer é proposto, ele é avaliado através de um estudo colaborativo realizado por diversos laboratórios, devidamente credenciados pela AOAC, que analisam simultaneamente os mesmos produtos empregando exatamente a mesma metodologia laboratorial. De acordo com os resultados desse estudo colaborativo, a AOAC dá seu parecer e o método pode ser aprovado. Nesse caso, esse novo método recebe o que se chama "first approval". Em seguida, o método fica durante dois anos sob vigilância da AOAC, para se verificar a ocorrência de problemas e falhas que apareçam durante seu emprego pelos usuários. Não havendo nenhuma queixa significativa nesse período, o método recebe a aprovação definitiva da AOAC ("final approval"). Os novos métodos são numerados e publicados no "*Official Methods of Analysis*" da AOAC e, a partir desse momento, podem ser utilizados como oficiais. Esse reconhecimento da AOAC, nos Estados Unidos, é aceito em nível internacional (Fung, comunicação pessoal).

Os vários métodos rápidos de interesse em alimentos são baseados em diferentes princípios. Por razões didáticas, os métodos rápidos, apresentados nesse estudo, foram agrupados em 7 categorias:

- 1 - técnicas envolvidas com o preparo do material necessário para uma análise microbiológica
- 2 - técnicas de microscopia
- 3 - métodos alternativos para contagem de microrganismos viáveis
- 4 - técnicas indiretas para enumeração de microrganismos viáveis
- 5 - técnicas genéticas
- 6 - técnicas imunológicas
- 7 - métodos miniaturizados para identificação de microrganismos

1 - Técnicas envolvidas com o preparo do material necessário para uma análise microbiológica

Para que qualquer resultado de análise tenha algum significado é absolutamente imprescindível que a amostra de alimento a ser analisado seja preparada adequadamente. Uma vez que nem sempre os microrganismos estão distribuídos de forma uniforme nos alimentos, é importante que o produto tenha uma homogeneização prévia. No caso de amostras sólidas, a porção a ser analisada deve ser representativa da amostra inteira. Rotineiramente, a porção da amostra corresponde a 25g, 50g ou 100g (ou ml) de produto. Essa porção, no caso de alimentos sólidos ou semi-sólidos, precisa ser homogeneizada com um diluente apropriado. A escolha desse diluente depende do tipo de produto em análise e do(s) microrganismo(s) pesquisado(s). Em alimentos ricos em gordura, é necessária a adição de um agente tensioativo para emulsificação.

A homogeneização da amostra com o diluente pode ser feita em um liquidificador convencional ou em homogeneizador próprio, devidamente esterilizado. Essa etapa da análise pode ser muito trabalhosa, demorada, tediosa, pouco higiênica e principalmente, pouco precisa. Para facilitar essa tarefa, foi lançado recentemente no mercado um **diluidor gravimétrico automatizado**, chamado Diluflo 800 (Spiral Biotech, Inc, MD, EUA). Esse aparelho é constituído de uma balança, que faz a pesagem da amostra, e de um dispositivo que adiciona ao recipiente de pesagem diluente estéril na quantidade apropriada para se obter a diluição programada no aparelho. O analista necessita apenas transferir uma porção qualquer do alimento em análise para o recipiente de pesagem e o aparelho faz a pesagem e a adição do diluente automaticamente. Esse aparelho pode ser também utilizado para distribuição de soluções, meios de cultura, etc.

O custo desse aparelho nos Estados Unidos é de US\$19,000.00.

Manninen e Fung, 1992, avaliaram esse instrumento, verificando que sua precisão, dependendo do volume de diluente necessário, é bastante alta, variando de 90 a 100%.

Para facilitar a tarefa de homogeneização da amostra com o diluente, pode ser utilizado um aparelho denominado **Stomacher** (Seward Medical Ltd., Londres, Inglaterra). Esse aparelho é constituído de uma câmara, dentro da qual existem duas pás que batem em um movimento de vai-vem. A amostra em análise e o diluente devem ser transferidos para um saco plástico apropriado, que deve ser colocado dentro da câmara. Com o batimento das pás o alimento se desmancha, e os microrganismos ficam na fase líquida. Não há nenhum contato do alimento com o instrumento. Atualmente, existem no mercado sacos plásticos especiais providos de um sistema de filtração para reter as partículas sólidas do homogeneizado, o que facilita a retirada das aliquotas necessárias.

Vários estudos foram realizados para se avaliar a eficiência desse processo de homogeneização. Ainda nos anos 70, Sharpe e Jackson, 1975, e Emswiler e cols., 1977, mostraram que resultados bastante satisfatórios podem ser obtidos, com inúmeras vantagens:

- utilização de sacos plásticos descartáveis que são baratos, eliminando a necessidade de uso de frascos especiais que precisam ser lavados e esterilizados continuamente;
- em alguns tipos de análise o saco plástico pode ser utilizado também para a incubação;
- não há formação de aerossóis, como aqueles que ocorrem com os homogeneizadores convencionais. Esse detalhe é particularmente importante quando se trabalha com produtos contendo patógenos ou outros materiais nocivos;
- não há geração de calor, que pode provocar injúria nos microrganismos;
- facilidade de operação.

Deibel e Banwart, 1982, no entanto, observaram que o Stomacher não era adequado para a separação de microrganismos que ficavam associados em cadeias ou em aglomerados (*S.aureus* e *B.cereus*, por ex.), não recomendando seu emprego em alimentos nos quais esse tipo de microrganismos prevalece.

Como desvantagem, visualiza-se também a necessidade de se trabalhar com sacos plásticos resistentes o suficiente para não romper durante a homogeneização de alimentos contendo partes pontiagudas (cascas, ossos, etc.).

2 - Técnicas de microscopia

A técnica DEFT (Direct Epifluorescence Technique) é um método rápido para contagem de microrganismos viáveis e não viáveis por microscopia. É talvez a técnica que oferece resultados mais rápidos entre todas as técnicas rápidas de uso em alimentos. Essa técnica foi desenvolvida há muitos anos para análise de leite, mas

atualmente é utilizada para vários outros tipos de alimentos.

Nessa técnica, a amostra devidamente homogeneizada e tratada com enzimas e tensioativos se necessário, é filtrada através de uma membrana de polycarbonato que retém os microrganismos. Essa membrana é então corada com um fluorocromo nucleofílico (alaranjado de acridina) e observada em um microscópio de fluorescência. O corante permite a diferenciação das células viáveis das não viáveis, pois DNA e RNA corados apresentam fluorescência de coloração diferente em função da fase do crescimento microbiano. Assim, células viáveis apresentam fluorescência laranja-avermelhada, enquanto células mortas tem fluorescência verde (Pettipher, 1980, Pettipher 1983, Sharpe, 1992, Sharpe, 1994). Davies, 1991, testou três outros corantes nucleofílicos, verificando que nem todos são tão eficientes quanto o alaranjado de acridina.

A técnica DEFT tem boa sensibilidade, resultante da concentração das células na superfície da membrana filtrante. Esse método tem sido utilizado satisfatoriamente para contagem de células viáveis em leite, onde, segundo Sharpe, 1992, é possível enumerar até 10^3 UFC/ml. Sua utilização tem sido recomendada para outros produtos também (Pettipher, 1989; Pettipher e Rodrigues, 1980; Pettipher e Rodrigues, 1982; Pettipher e cols., 1980).

Sharpe, 1994, no entanto, ressaltou que a técnica DEFT é muito cansativa, e pode ter sua boa correlação com os métodos convencionais de contagem prejudicada pela fadiga do analista. Além disso, alguns fatores, como injúria das bactérias, causada principalmente pelo calor, podem alterar a fluorescência das células (Back e Kroll, 1991).

A contagem no microscópio de fluorescência pode ser automatizada, através da utilização de um processador de imagem acoplado a um contador computadorizado. Diversas empresas comercializam esses processadores: SBSysDEFT,

Scan Beam A/S, Denmark; Micromeasurements Ltd, Essex, UK e Foss Electric, York, UK, entre outros. Recentemente, foi introduzido no mercado um instrumento que faz todas as etapas (filtração, coloração, lavagem, secagem e contagem) da técnica DEFT automaticamente, denominado COBRA (Biocom, França). Pettipher e cols., 1992, reportaram índices de correlação muito bons entre os resultados de contagem bacteriana obtidos no COBRA e nos métodos convencionais em leite cru, carne e peixe e também em culturas puras.

O custo mínimo estimado de um equipamento para DEFT (microscópio e processador de imagem) nos Estados Unidos é de US\$ 120,000.00.

A técnica DEFT tem uma aplicação interessante na identificação de alimentos que tenham sido submetidos a irradiação. Nesse caso, bactérias mortas por irradiação fluorescem como se continuassem viáveis mas não são cultiváveis em meios de cultura. Se um produto foi irradiado, há uma diferença na contagem de viáveis pelo método DEFT e naquela obtida pelo plaqueamento convencional. Em caso de alimentos não irradiados, as duas contagens são muito próximas (Abgrall e Bourgeois, 1989; Betts e cols., 1988, Copin e Bourgeois, 1992; Sjoberg e cols., 1991, Copin e cols., 1993).

Uma variação da técnica DEFT constitui o princípio de funcionamento de um aparelho chamado Bactoscan III ou 8000 (Foss Electric, Hillerod, Denmark), utilizado principalmente para a enumeração de microrganismos viáveis em leite. As amostras são inicialmente tratadas para lise das células somáticas, e em seguida, são centrifugadas e o resíduo é tratado com alaranjado de acridina. O resíduo corado é transferido para um disco rotatório que é lido por um microscópio de fluorescência computadorizado. Um analisador de pulsos converte os sinais em unidades Bactoscan que corresponde à contagem de microrganismos viáveis. Vários estudos mostraram que, dependendo do tipo de alimento, uma excelente correlação entre as contagens obtidas nesse aparelho e pelo método

convencional pode ser obtida ($r = 0,877$ a $0,983$), com a vantagem da disponibilidade de resultados em 7 minutos (Maxcy e Paul, 1987; Suhren, 1989; Rodriguez-Otero e cols., 1993). Segundo esses autores, o custo elevado do equipamento, no entanto, torna seu uso limitado a laboratórios de grande porte.

3 - Métodos alternativos para contagem de microrganismos viáveis

O método convencional de contagem de microrganismos envolve o plaqueamento de alíquotas do alimento homogeneizado e de suas diluições em meios de cultura sólidos adequadamente selecionados em função do objetivo da análise. O plaqueamento pode ser feito por semeadura na superfície do meio previamente distribuído em placas ou então o meio de cultura pode ser adicionado após a transferência das alíquotas para placas vazias. As placas são então incubadas na temperatura e pelo tempo necessários, determinados pelo tipo de análise a ser feita. Após a incubação, as colônias viáveis são enumeradas e esse número, multiplicado pela diluição efetuada fornece o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por g ou por ml de produto (BAM/AOAC, 1992).

A enumeração das colônias nas placas pode ser feita manualmente, com o auxílio de lupas e iluminadores apropriados quando necessário. Podem ser empregados contadores tipo Quebec. Alguns aparelhos fazem essa contagem automaticamente, através de recursos eletrônicos ou ainda leitura a laser.

A enumeração de colônias por plaqueamento em superfície ou em profundidade é, com toda certeza, a mais usada em qualquer laboratório de controle microbiológico de alimentos. Vários grupos de microrganismos diferentes podem ser quantificados dessa maneira, variando-se apenas o meio de cultura ou as condições da incubação (tempo,

temperatura e atmosfera). Apesar da aparente simplicidade dessa técnica, ela pode ser muito trabalhosa quando o número de diluições a serem plaqueadas é grande e quando diferentes grupos de microrganismos precisam ser enumerados. Quando o número de amostras a ser analisado é grande também, o trabalho pode ser bastante tedioso, colocando em risco a precisão dos resultados obtidos. A leitura dos resultados pode ser também muito cansativa e imprecisa.

Para simplificar o trabalho do laboratorista e melhorar a qualidade da análise feita, vários métodos de plaqueamento alternativos estão hoje disponíveis. O mais antigo e mais conhecido é a **técnica de plaqueamento em espiral**, utilizando-se um aparelho denominado Spiral Plater (Spiral Biotech, Inc, Bethesda, MD, EUA). O instrumento succiona, através de uma bomba de vácuo, uma alíquota do produto em análise, adequadamente homogeneizado com um diluente, dispensando-a na superfície de uma placa com meio de cultura posicionada sobre uma plataforma giratória. A semeadura é feita automaticamente por uma cânula de teflon que se desloca do centro da placa para as suas bordas, à medida que a placa gira, formando uma espiral (espiral de Arquimedes). Forma-se um gradiente de concentração, que se inicia no centro e diminui à medida que se dirige para as bordas da placa. O volume de líquido depositado em cada segmento da placa é conhecido. As placas inoculadas são incubadas e as colônias podem ser enumeradas colocando as placas em cima de um modelo no qual está impresso o desenho de uma placa subdividida em segmentos. A cada segmento corresponde um fator de multiplicação, relacionado com o volume de líquido nele depositado. Deve-se selecionar o segmento no qual a contagem de colônias é possível, multiplicando-se a contagem obtida pelo fator correspondente, obtendo-se assim o número de UFC por g ou por ml de produto.

A contagem de colônias obtidas através do plaqueamento em espiral pode ser feita através de um contador semi-automático (EasyCountTM System, Spiral Biotech, Inc., MD, EUA) ou de contadores a laser (CASBA II ou CASBA III System, Spiral Biotech, Inc., MD, EUA), que, computadorizados, permitem a obtenção imediata do número de UFC por g ou por ml de produto.

Em uma única placa é possível contar 3 ciclos log de colônias, o que significa muita economia de meio de cultura, já que uma placa plaqueada em espiral corresponde a três plaqueadas pelo método convencional. Há também economia de vidraria de laboratório, de espaço no laboratório (bancadas, incubadoras, autoclaves, etc.), além da simplificação do trabalho laboratorial.

A tecnologia de plaqueamento em espiral é uma das mais antigas entre os métodos automatizados rápidos para análise microbiológica. Ao longo desses anos, vários estudos de avaliação do plaqueamento em espiral foram realizados. Schalkowsky, 1986, obteve resultados bastante satisfatórios trabalhando com uma grande variedade de alimentos. Mais recentemente, Manninen e cols., 1991, trabalhando com culturas puras de bactérias e bolores e também com amostras de leite cru, avaliaram o sistema de plaqueamento em espiral usando o contador semi-automático e um a laser, obtendo excelente correlação com as contagens obtidas pelo método convencional de plaqueamento. Posteriormente, Manninen e Fung, 1992, fizeram uma avaliação semelhante em carnes, e idealizaram um protocolo utilizando os dois métodos combinados para quantificar a carga microbiana de carcaças de suínos.

Recentemente, o plaqueador em espiral foi modernizado. O novo aparelho (Autoplater, Spiral Biotech, Inc, etc) é totalmente automático, fazendo a semeadura das placas e lavagem e esterilização da cânula para nova semeadura.

O custo de um aparelho de plaqueamento em espiral gira em torno de US\$ 13,000.00 (modelo comum) ou US\$ 18,500.00 (modelo totalmente automático). Os contadores, por sua vez, custam US\$ 540.00 (semi-automático) e US\$ 15,000.00 (a laser).

O inconveniente do sistema de plaqueamento em espiral, além do custo, é a necessidade de se ter um alimento bem homogeneizado e perfeitamente fluido para que a cânula não venha a entupir durante a semeadura. Esse problema pode ser evitado se o homogeneizado for filtrado ou tratado com enzimas ou se o alimento for homogeneizado em um Stomacher com saco plástico provido de filtro.

O método de plaqueamento em espiral para contagem de bactérias em alimentos e cosméticos obteve a aprovação inicial da AOAC em 1977 e a definitiva em 1981 (AOAC final action, method 977.27).

Outro método alternativo para contagem de microrganismos viáveis em alimentos é a **técnica da membrana filtrante**. Nessa técnica, o produto é homogeneizado e filtrado através de uma membrana de nitrocelulose ou acetato de celulose, com porosidade adequada para reter os microrganismos. Para impedir o entupimento dos poros da membrana, o alimento pode ser tratado com agentes tensioativos ou enzimas digestivas. Sacos plásticos com filtros para a homogeneização do alimento em análise são também recomendados.

Após a filtração e retenção dos microrganismos, a membrana é transferida para a superfície de placas de petri contendo o meio de cultura de escolha. O meio de cultura se difunde entre os poros da membrana filtrante e após a incubação, aparecem colônias visíveis na superfície. As colônias podem então ser contadas, manual ou automaticamente, e ainda serem repicadas para testes posteriores, quando necessário (Entis, 1986).

Essa técnica é empregada há muito tempo para análise microbiológica de água com grande vantagem em relação aos demais métodos de contagem, devido à possibilidade de se

filtrar grande volume de amostra.(APHA, 1992c), Tem sido utilizada também para análise de bebidas e outros alimentos fluidos, tendo sido adaptada para análise de outros tipos de alimentos (Busta e Speck, 1965; Fifield, 1957; Leite e cols., 1991; Macxy, 1970; Nutting e cols., 1958; Peterkin e Sharpe, 1981). Recentemente, Bonvehi e Jordá, 1993, publicaram um trabalho relatando a conveniencia da determinação da carga microbiana pela técnica da membrana filtrante como forma de controle da qualidade do mel.

No Brasil, Brancher, 1992, desenvolveu no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas um estudo de avaliação da técnica da membrana filtrante para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em leite e derivados. Foi observado que os resultados obtidos com essa técnica foram equivalentes a aqueles obtidos pela técnica dos tubos multiplos para contagem de coliformes totais em 76% das 150 amostras de leite e derivados analisados. Foi verificada também equivalência em 78,4% das amostras analisadas para coliformes fecais e 72,7% das amostras analisadas para *E.coli*. Na enumeração de bactérias heterotróficas, a técnica da membrana filtrante foi equivalente ao método tradicional de plaqueamento em 83,2% das amostras. Os resultados obtidos pela técnica da membrana filtrante foram superiores aqueles observados pela técnica dos tubos múltiplos em 20,7%, em 8,1% e em 18,2% das amostras analisadas para coliformes totais, coliformes fecais e *E.coli*, respectivamente. Na contagem de bactérias heterotróficas, a técnica da membrana filtrante foi superior em 9,2% das amostras. A análise estatística dos resultados obtidos no estudo de Brancher, 1992, indicou que não houve diferença significativa ($\alpha=0,5\%$) entre os resultados obtidos pelas duas técnicas.

Em 1974, pesquisadores canadenses desenvolveram um novo tipo de membrana, que denominaram HGMF (Sharpe e Michaud, 1974). Essas membranas são atualmente produzidas e comercializadas por QA Life Sciences Inc., CA, EUA, sob o nome de **membranas Isogrid**. Essas membranas diferem das convencionais pois tem impresso em sua superfície um quadriculado ("grid") hidrofóbico, com 1600 pequenos quadrados. Para sua utilização, as membranas são inseridas em um sistema de filtração próprio, semelhante ao utilizado no método de filtração convencional, e após a filtração do alimento adequadamente homogeneizado e tratado com enzimas ou agentes tensioativos, a membrana Isogrid é retirada do sistema de filtração e transferida para a superfície do meio sólido apropriado. Para melhorar a eficiência do processo, o sistema de filtração tem um pré-filtro que retém partículas grandes presentes no homogeneizado. Durante a incubação das placas com as membranas ocorre o desenvolvimento de "colônias" que são quadradas, de tamanho no máximo igual ao de cada quadradinho da membrana. Sua contagem pode ser feita manualmente ou eletronicamente através de um contador próprio (MI-200 Interpreter System, Richard Brancker Research Ltd, Ottawa, Canada), e os resultados referem-se a determinação do número mais provável (NMP) e não ao número de unidades formadoras de colônias, como ocorre no método convencional.

A membrana Isogrid, assim como a membrana convencional, tem vantagens bastante interessantes em relação aos métodos convencionais:

- na técnica da membrana filtrante há remoção dos componentes dos alimentos que podem interferir no crescimento microbiano (inibidores de microrganismos, nutrientes que modificam a especificidade do meio de cultura, etc.);
- microrganismos presentes em pequeno número, não detectáveis pelos métodos convencionais, podem ser "concentrados" pela filtração de um volume maior de amostra;

- membranas filtrantes podem ser transferidas de um meio para outro;
- uma única placa permite a contagem de 1 até $1,6 \times 10^3$ UFC, o que, dependendo do produto em análise, elimina a necessidade de se efetuar diluições decimais a partir do homogeneizado;
- as membranas filtrantes podem ser utilizadas para testes complementares para identificação das colônias, como provas bioquímicas, testes de hibridização de DNA, testes imunoenzimáticos, etc.

Uma vantagem adicional importante é que, estando o sistema de filtração disponível, o custo por análise, quando comparado ao método convencional, é bastante baixo. Segundo Chain e Fung, 1991, o custo de uma contagem total de aeróbios utilizando a membrana Isogrid é de US\$ 3.33, bastante inferior ao custo dessa mesma análise pelo método convencional (US\$ 13.62).

Além das membranas Isogrid, QA Life Sciences Inc., CA, EUA, comercializa os seguintes meios de cultura, a serem utilizados com as membranas para a enumeração dos seguintes microrganismos:

- contagem total de bactérias: o meio de cultura é agar Tryptose Soy Fast Green, no qual há formação de "colônias" de coloração azul ou verde após incubação a 35°C por 48+/-3h.
- contagem de bolores e leveduras: o meio de cultura utilizado é o PDGCA (potato dextrose glycerol congo red agar), incubado a 30°C por 48+/-3h. A leitura deve ser feita sob luz UV (366nm), e os bolores, em sua maioria, tem fluorescência laranja.
- coliformes totais/*E.coli*: O meio de cultura é agar LMG (lactose monensin glucuronate agar) com incubação por 24h+/-2h a 35°C. Nesse meio os coliformes são azuis e os não-coliformes são amarelos. Para contagem de *E.coli*, essa membrana deve ser em seguida transferida para agar BMA (buffered MUG agar), com incubação a 35°C por 2h. Nesse meio, *E.coli* desenvolve fluorescência azul quando observada na luz UV (366nm).

- *Salmonella*: Nesse caso deve ser feito um pré-enriquecimento em meio não seletivo por 18-24h a 35°C, um enriquecimento seletivo por 6-8h a 35°C e plaqueamento em agar EF-18, que deve ser incubado a 42°C por 18-24h. Nesse meio de cultura, as "colônias" de *Salmonella* são verdes ou verde-azuladas.

- *Escherichia coli* 0157:H7 (teste presuntivo): Esse patógeno é detectado por plaqueamento em agar SD-39, incubado a 44,5°C por 24+/-2h. Nesse meio, *E.coli* 0157:H7 apresenta coloração rosa. As colônias com essa coloração devem ser submetidas a testes sorológicos para confirmação.

Das determinações acima mencionadas, as seguintes tem aprovação final da AOAC:

- bactérias totais: AOAC final action method 986.32;
- coliformes totais/*E.coli*: AOAC final action method 990.11;
- *Salmonella*: AOAC final action method 991.12.

A AOAC apresenta, no texto referente ao método 986.32 relativo à contagem de bactérias totais, uma tabela especificando o tratamento enzimático que pode ser utilizado para cada tipo de alimento para melhorar sua filtrabilidade (AOAC, 1990).

Além das determinações aprovadas oficialmente pela AOAC, as membranas Isogrid são também utilizadas para a pesquisa dos seguintes microrganismos:

- *Staphylococcus aureus* em agar BPEY (Baird Parker Egg Yolk agar), com incubação a 35°C por 48+/-3h;
- estreptococos fecais em agar M-ENT (*m-Enterococcus* agar), com incubação a 35°C por 48+/-3h;
- bactérias gram-negativas em agar CVT (crystal violet tetrazolium agar), com tempo/temperatura de incubação dependente do tipo de microrganismo procurado (mesófilo, psicrófilo, etc);
- *Vibrio parahaemolyticus* em agar VPS (*Vibrio parahaemolyticus* sucrose agar) a 35°C por 4h e, em seguida, em agar TSAMS (tryptone soy magnesium sulfate salt agar) a 42°C por 16-18h;

- *Yersinia enterocolitica* em agar YLA (*Yersinia lysine* agar), que deve ser semeado após enriquecimento da amostra em KOH/PBS por 48h a 18°C;
- *Clostridium perfringens*, em agar TSCY (tryptose sulfite cycloserine yeast extract agar), incubado em anaerobiose por 24+/-2h a 35°C;
- *Pseudomonas aeruginosa*, em agar PAS (*Pseudomonas aeruginosa* selective agar), incubado a 42°C por 24-30h.

As membranas Isogrid tem sido utilizadas com muito sucesso para contagem de microrganismos viáveis em vários tipos de alimentos como leite, carne, condimentos, farinhas, vegetais, frutos do mar, etc (De Paola e cols., 1988; Entis, 1983, 1984, 1986, 1989, 1990; Entis e Boleszczuk, 1990; Sharpe e Peterkin, 1988; Todd e cols., 1988, 1993).

Uma grande revolução nos métodos de análise microbiológica de alimentos foi provocada com o lançamento das **placas Petrifilm** (3M Co, St. Paul, MN, EUA). Os princípios nos quais essa metodologia está baseada, bem como resultados referentes à sua validação, em estudos realizados em vários países e também no Brasil, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, estão descritos detalhadamente na Parte II desse trabalho.

Certas propriedades bioquímicas peculiares de *Escherichia coli* tem permitido a padronização de técnicas mais rápidas para sua enumeração nos alimentos. Sabe-se que a pesquisa de *E.coli* em alimentos tem grande importância no controle de qualidade, uma vez que sua presença indica condições precárias de higiene durante a produção, e conseqüentemente, a possível presença de uma grande variedade de microrganismos patogênicos de origem intestinal.

Uma das propriedades bioquímicas mais exploradas é a capacidade de *Escherichia coli* produzir β -glucuronidase, que é facilmente observada quando se emprega substratos glucuronídicos. Esses substratos, na presença dessa enzima, são reduzidos rapidamente a umbeliferonas que são fluorescentes quando observadas sob luz UV de onda longa. Técnicas baseadas nessa propriedade de *E.coli* são denominadas **técnicas fluorogênicas**. Em caldo lactosado lauril sulfato de sódio, uma célula de *E.coli* por ml de amostra é capaz de desenvolver fluorescência num período de 12 a 20h, que é quando atinge o número de 10^7 a 10^8 células por ml. Quando o inóculo é de 10^4 células por ml a fluorescência pode ser observada num período de 4 a 6h, embora a produção de gás só possa ser observada após 9h (Feng e Hartman, 1982; Moberg, 1985).

Essa propriedade de *E.coli* é a base de um método rápido para determinação de contaminação fecal em alimentos, no qual MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo) é adicionado a diferentes meios de cultura, podendo ser utilizado na técnica dos tubos múltiplos e também em plaqueamento em meios sólidos. Inicialmente sugerida por Feng e Hartman, 1982, passou a ser utilizada em vários tipos de alimentos e também em água (Alvarez, 1984; Andrews e cols., 1987; Balebona e cols., 1990; Koburger e Miller, 1985; Moberg, 1985; Moberg e cols., 1988; Motes e Peeler, 1991; Peterson, 1987; Poelma e cols., 1987; Robinson, 1984).

No Brasil, Goularte, 1992, desenvolveu no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas um estudo de avaliação do método fluorogênico para enumeração de *Escherichia coli* em leite e derivados. Nesse trabalho, desenvolvido com 120 amostras de leite cru, leite pasteurizado, queijo tipo Minas frescal e sorvete, verificou-se que o método fluorogênico, empregado na técnica do numero mais provável, foi equivalente ao método clássico dos tubos múltiplos para leite cru quando a leitura foi feita com

24h de incubação e para queijo quando a leitura foi feita com 48h de incubação. O método fluorogênico, entretanto, não se mostrou adequado para a enumeração de *E.coli* em leite pasteurizado e sorvete devido ao grande número de resultados falso-positivos. No estudo de Goularte, 1992, ficou muito evidente que a fluorescência é dependente do pH do meio. Assim, em meios que ficam muito ácidos devido à fermentação da lactose é necessário alcalinizar o pH para que a fluorescência possa ser observada.

A metodologia fluorogênica para pesquisa de *E.coli* pela técnica dos tubos múltiplos tem aprovação da AOAC para alimentos refrigerados e congelados (AOAC first action method 988.19).

A capacidade de *Escherichia coli* produzir glucuronidases tem sido empregada também em outros sistemas para contagem de *E.coli*: é o princípio de funcionamento das placas Petrifilm (3M do Brasil, Ltda) para essa finalidade, e também da metodologia de contagem de *E.coli* em membranas Isogrid (QA Life Sciences, Inc., CA, EUA).

Essa propriedade tem sido bastante explorada na idealização de novos meios de cultura específicos para *E.coli*, como, por exemplo, agar BCIG (Ogden e Watt, 1991), agar m-LGA (Sartory e Howard, 1992), meio MUG-7 ((Sarhan e Foster, 1991), MI agar (Brenner e col.s, 1993), só para citar alguns.

Há no mercado um kit baseado na produção de glucuronidase destinado à determinação rápida (24h) da presença ou ausência de coliformes e de *E.coli* em água (Colilert™, Environetics, ME, EUA): presença de coliformes é indicada pelo desenvolvimento de cor amarela no frasco e de *E.coli* pelo desenvolvimento de fluorescência (APHA, 1992c). Um kit similar para pesquisa de coliformes e de *E.coli* em alimentos em 48h é o ColiComplete™ (BioControl Systems, WA, EUA). Esse kit constitui-se em um disco impregnado com MUG e com X-Gal que deve ser adicionado ao caldo lauril sulfato triptose utilizado na técnica dos tubos múltiplos convencional. Se

após a incubação, o caldo ficar azul, a amostra em teste é positiva para coliformes, e se além de azul, ficar também fluorescente, o teste é positivo para *E.coli* (Feldsine e cols., 1994).

4 - Técnicas indiretas para enumeração de microrganismos viáveis

Os métodos descritos no item anterior baseiam-se na multiplicação de microrganismos em meios de cultura apropriados, ou seja, formação de colônias visíveis em meios de cultura sólidos ou desenvolvimento de turvação em meios de cultura líquidos. Várias técnicas indiretas, não dependentes da formação de colônias, podem ser empregadas para enumeração de microrganismos, destacando-se as técnicas de bioluminescência e de impedância-condutância.

A metodologia de bioluminescência baseia-se no princípio de que a quantidade de ATP (adenosina trifosfato) em um alimento está relacionada ao número de células metabolicamente ativas presentes, inclusive microrganismos. Uma das formas mais simples de se quantificar ATP é através do sistema luciferina-luciferase, extraído da cauda de vagalumes, ou produzido por microrganismos especiais obtidos por técnicas de DNA recombinante (Larocco e cols., 1986; Sharpe, 1994).

Nesse sistema, ATP reage com a enzima luciferase, na presença de luciferina, formando um complexo, que, em contato com o oxigênio e com ions magnésio, sofre uma descarboxilação, com emissão simultânea de luz. A quantidade de luz gerada por essa reação é proporcional à quantidade de ATP presente, que, por sua vez, é proporcional à quantidade de microrganismos viáveis presentes.

A quantidade de luz emitida pode ser monitorada por um luminômetro, por um fluorímetro ou por um espectrofotômetro de cintilação líquida. Existem no

mercado diversos aparelhos para essa finalidade: LKB Luminometer (LKB Instruments, Inc., MD, EUA), Turner Designs (Mountain View, CA, EUA), Lumac Biocounter (Integrated Biosolutions, Inc., NJ, EUA), BioTrace (San Diego, CA, EUA), entre outros.

A técnica da bioluminescência é realmente rápida, requerendo menos de 30 minutos para o fornecimento de resultados. Limites teóricos de detecção por essa metodologia estão em torno de 10-200 bactérias/g, mas, na prática, esses limites são mais elevados: 10^5 células por g, ou até mais (Baker e cols., 1992; Jarvis, 1984; Griffiths, 1992). Na verdade, o que ocorre é que outras células, não bacterianas, como leucócitos e células musculares, também contém ATP. Por essa razão, o sucesso da técnica de bioluminescência depende da eficiência do processo de separação das células bacterianas das demais células presentes em um alimento, ou seja, da eficiência do processo de destruição do ATP intrínseco antes da análise.

Littel e cols., 1986, reportaram que a técnica de bioluminescência detectava 5×10^4 UFC/g de carne. Ward e cols., 1986, encontraram boa correlação entre a técnica ATP e a técnica convencional na avaliação da qualidade microbiológica de pescado. Outros autores também empregaram essa técnica para monitorar a carga microbiana em carne (Kennedy e Oblinger, 1985, Stannard e Wood, 1983a), em sucos de frutas (Graumlich, 1985) e em produtos lácteos (Bautista e cols., 1992; Philips e Griffiths, 1985; Van Crombrugge e cols., 1989).

Essa técnica vem sendo bastante utilizada para determinação da contaminação de superfícies, ou seja, da eficiência dos procedimentos de sanitização de equipamentos e de manipuladores (Poulis e cols., 1993; Bautista e cols., 1992).

Recentemente, Promega Co, (Madison, WI, EUA), Analytical Luminescence Laboratory (San Diego, CA, EUA) e Charm Sciences Inc. (Malden, MA, EUA) colocaram no mercado kits para monitoramento rápido de contaminação microbiana

em leite e derivados, água, bebidas e também em plantas industriais. Esses kits são compostos pelos reagentes necessários para destruição do ATP não-microbiano (extracelular), para a liberação do ATP microbiano (intracelular), para a reação propriamente dita (luciferina, luciferase e magnésio) e por um luminômetro portátil, além de frascos e pipetas descartáveis, para evitar contaminação com ATP não pertencente ao alimento.

A técnica de bioluminescência pode ser empregada também para a pesquisa e identificação de patógenos em alimentos. Utilizando-se técnicas de DNA recombinante, Stewart e cols., 1989, inseriram o gen lux de uma bactéria naturalmente luminescente (*Vibrio fischeri*) no bacteriófago P22, específico para *Salmonella typhimurium*. Colocando o fago geneticamente modificado em contacto com *Salmonella*, esse patógeno torna-se luminescente em 30-50 minutos, com um limite de detecção de 1000 células. Essa nova técnica pode ser utilizada para detecção rápida de *Salmonella* em alimentos (Stewart, 1990) como também pode ser utilizada para sua quantificação através de um método de NMP (Turpin e cols., 1993). Nesse caso a fonte de energia não é ATP mas FMNH₂ (flavina mononucleotideo reduzido).

Segundo Griffiths, 1993, esses avanços recentes na metodologia de bioluminescência oferecem novas e interessantes possibilidades para detecção de patógenos e de microrganismos deteriorantes em laticíneos e outros tipos de alimentos.

As técnicas de impedância e condutância são baseadas na propriedade que os microrganismos tem de alterar a impedância e/ou a condutância de um meio de cultura. Essas alterações ocorrem como consequência da mudança de composição química desse meio devido a 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 resulta em alterações mensuráveis na condutância e na impedância elétrica do meio de cultura.

Atualmente são conhecidos três sistemas destinados à quantificação de microrganismos por essa metodologia. O mais conhecido, utilizado inclusive por algumas indústrias alimentícias brasileiras, é o Bactometer (bioMerieux sa, França), que mede mudanças de impedância. O aparelho é composto de uma incubadora na qual devem ser introduzidos os módulos plásticos descartáveis contendo pequenas câmaras providas de eletrodos e de um sistema computadorizado para monitoramento dos dados. Cada amostra em análise é transferida para uma das câmaras do módulo, aos quais se adiciona o meio de cultura de interesse de acordo com o(s) microrganismo(s) procurado(s). Os módulos são colocados na incubadora, de modo a fechar o circuito elétrico, e o sistema elabora uma curva de impedância para cada amostra individualmente. Na curva de impedância, é definido o "tempo de detecção", ou seja, o tempo necessário para que a curva, inicialmente plana, passe a se elevar, indicando alteração na impedância. Essa elevação ocorre quando a concentração microbiana atinge 10^6 a 10^7 microrganismos por ml. O "tempo de detecção" é inversamente proporcional à quantidade de microrganismos presentes. Através de curvas padrão é, portanto, possível determinar o número de microrganismos presentes em um sistema qualquer, assim como é possível saber se um produto qualquer está ou não acima de um limite ou especificação. O custo desse aparelho é de US\$ 80,000.00.

Funcionando de forma bastante semelhante, o segundo sistema relacionado com essa técnica denomina-se Malthus System (Malthus Instruments Ltd., West Sussex, Inglaterra), e é baseado em medidas de condutância. O aparelho é constituído de um banho-maria, tubos de ensaio providos de eletrodos e um sistema computadorizado para análise e interpretação dos dados. Os tubos contêm o meio de cultura de escolha e o sistema funciona da mesma forma

que o anterior. O "tempo de detecção" é monitorado, determinando-se o número de microrganismos presentes baseando-se em curvas padrão previamente elaboradas. O custo desse aparelho é também de US\$ 80.000,00.

O terceiro sistema, denominado RABIT ("rapid bacterial impedance test"), de Don Whitley Scientific, Inglaterra, funciona de modo identico ao Bactometer, fazendo também medidas de impedância. Esse sistema é mais barato que o Bactometer: US\$ 20,000.00.

A técnica de impedância foi, durante muito tempo, utilizada apenas para monitoramento de esterilidade, por exemplo, de sucos de frutas submetidos à processamento UHT. Posteriormente passou a ser utilizada também para quantificação de microrganismos em leite, laticíneos, carnes e outros tipos de alimentos (Arnott e cols., 1988; Bishop e White, 1985; Chen e cols., 1993; Smith e cols., 1989; Zindulis, 1984; Waes e Bossuit, 1984).

Prentice e cols., 1989, utilizaram o sistema Malthus para determinar 8 sorotipos diferentes de *Salmonella* em leite em pó, comparando os resultados com aqueles obtidos pela metodologia convencional. Para isso, fizeram um pré-enriquecimento não seletivo, e, em seguida, um enriquecimento seletivo em caldo selenito contendo TMAO (óxido de trimetilamina), dulcitol e lisina (meio de Easter e Gibson) que foi utilizado para monitoramento da impedância (Malthus). Esse método transformou-se no primeiro método oficial do Ministério da Agricultura britânico. Em 1991, foi também reconhecido como oficial pela AOAC (AOAC first action method 991.38), após o estudo colaborativo desenvolvido por Gibson e cols., 1992, envolvendo 17 laboratórios que analisaram leite em pó desnatado, carne moída, pescado, côco, ovo líquido e frutas secas. Nesse estudo demonstrou-se que o método necessita de, no máximo, 48h para um teste completo.

O meio de Easter e Gibson é o mais comumente utilizado na análise de *Salmonella* em alimentos pela técnica de impedância. Outros meios de cultura tem sido estudados, com o objetivo de minimizar os resultados

falso-positivos que podem acontecer, principalmente em produtos cárneos, devido a interferência de *Citrobacter* e *Hafnia* (Di Falco e cols., 1993; Donaghy e Madden, 1992, 1993).

Em 1989, Owens e cols., descreveram uma técnica de impedância indireta. Nessa técnica é baseada na detecção de CO₂ produzido a partir de nutrientes do meio de cultura. O CO₂ é absorvido por uma solução alcalina ou por um agar alcalino nos quais se faz a medida da impedância. Essa alteração na metodologia diminuiu consideravelmente o número de resultados falso-positivos, observados nas técnicas diretas (Donaghy e Madden, 1993).

A técnica de condutância foi utilizada em conjunto com a técnica de imunoseparação magnética por Parmar e cols., 1992, para detecção de *Salmonella* em leite em pó artificialmente contaminado com uma série de microrganismos, com resultados considerados muito bons: 20 células de *Salmonella* por ml de leite foram detectadas após 7,5h em um caldo submetido a pré-enriquecimento por 6h.

Outros grupos de microrganismos de interesse em alimentos começaram recentemente a ser pesquisados através de técnicas de condutância e impedância. Ogden, 1993, idealizaram um meio para detectar *Escherichia coli*, inclusive *E.coli* O157:H7, baseado em sua capacidade de fermentar ácido D-glucurônico e de reduzir TMAO, utilizando técnicas de condutância (Malthus). Bolliger e cols., 1994, determinaram a eficiência de técnicas de impedância na quantificação de bactérias totais e de Enterobacteriaceae em alimentos artificialmente contaminados com níveis baixos e altos desses microrganismos. Esses autores verificaram que cargas microbianas de 10⁶ UFC podiam ser detectadas em 5h no sistema Bactometer e em 6h no sistema Malthus. Enterobacteriaceae já haviam sido quantificados por condutância por Cousins e Marlatt, 1990, em leite cru naturalmente contaminado. Esses autores verificaram que <10 e 500 UFC/ml podiam ser detectados em 12h e 6h,

respectivamente, com excelente correlação com o método de plaqueamento convencional. Hancock e cols., 1993, idealizaram um meio seletivo para detectar *Listeria* spp. pela técnica de impedância em apenas 36h.

5 - Técnicas genéticas

Entre as várias técnicas genéticas disponíveis no momento, as de hibridização de DNA e a reação de polimerase em cadeia (PCR) são, por enquanto, as técnicas mais utilizadas no controle microbiológico de alimentos.

Os testes de hibridização de DNA são realizados com sondas genéticas que são fragmentos de DNA de fita simples, capazes de reconhecer e formar híbridos com fitas complementares de DNA ou RNA. As sondas genéticas podem ser radioativas (marcadas com ^{32}P) ou colorimétricas (marcadas com enzimas) (Hill, 1989; Hill e Keasler, 1991; Schleifer, 1990; Wolcott, 1991).

A hibridização de DNA pode ser realizada de duas formas: em base sólida, quando o DNA-alvo fica fixo a um suporte sólido, e em base líquida, quando o DNA-alvo fica disperso em um líquido.

Para a realização de um teste de hibridização de DNA em fase sólida, os microrganismos são inicialmente fixados a um suporte sólido, como por exemplo, membranas de celulose, nitrocelulose ou acetato de celulose. Os microrganismos são então tratados adequadamente para expor seu DNA e para provocar a denaturação, isto é, a separação das duas fitas. O suporte sólido é então colocado em uma solução de hibridização que contém a sonda genética e demais componentes necessários para a reação. Após lavagem, os filtros são revelados, usando técnicas de autoradiografia quando as sondas são radioativas ou técnicas colorimétricas quando as sondas são marcadas com enzimas.

No teste de hibridização em base líquida, o procedimento básico é o mesmo, apenas os microrganismos, e consequentemente o DNA-alvo, encontram-se em solução.

As sondas genéticas podem ser naturais, com tamanho variando de 10 a milhares de nucleotídeos, ou sintéticas, com 16 a 40 nucleotídeos. A grande maioria das sondas genéticas são de DNA, mas existem também as de RNA.

Sondas genéticas são "armazenadas" através da inserção em plasmídios replicativos e, para sua utilização nos testes de hibridização, as sondas devem ser removidas dos plasmídios, o que é obtido por tratamento enzimático com enzimas de restrição. Essas enzimas são endonucleases específicas que hidrolizam o DNA plasmidial em locais pré determinados.

Os testes de hibridização, para serem eficientes, necessitam da presença de 10^5 a 10^6 células bacterianas, o que limita sua sensibilidade. Para que essa concentração seja atingida, é preciso submeter o alimento a uma ou mais etapas de pré-enriquecimento.

A pesquisa de microrganismos em alimentos utilizando técnicas de hibridização de DNA requer um laboratório adequadamente equipado, com analistas muito bem treinados. Para facilitar o uso de sondas genéticas em laboratórios de análise de alimentos, uma companhia americana denominada Integrated Genetics, Inc. (Framingham, MA) idealizou um sistema chamado Gene-Trak, bastante simples e prático. Os primeiros sistemas GeneTrak introduzidos no mercado utilizavam sondas de DNA radioativas. Posteriormente, esses sistemas foram modificados e passaram a empregar sondas colorimétricas, destinadas à detecção de RNA ribossomal bacteriano (rRNA). Considerando que uma bactéria tem entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA ribossômico e somente uma cópia de DNA, a eficiência do novo sistema é bastante superior à do sistema original. O número máximo de ribossomos presentes por célula é atingido quando o microrganismo está em fase logarítmica de crescimento, daí a necessidade de uma ou mais etapas de pré-enriquecimento.

O sistema Gene-Trak é baseado em hibridização em fase líquida, havendo a participação de duas sondas diferentes: uma de captura, que tem uma "cauda" polideoxiadenílica (poli-dA) e uma de detecção, marcada com fluoresceína nas extremidades 3'e 5'.

Após o enriquecimento em meio líquido e tratamento das amostras para lise e liberação do rRNA, adiciona-se as sondas de captura e de detecção do sistema GeneTrak. Os híbridos formados entre o rRNA bacteriano e as sondas de detecção são capturadas por um bastão de poliestireno recoberto de ácido polideoxitimidínico (poli-dT), que é complementar à cauda polideoxiadenilica (poli-dA) da sonda de captura. Com a introdução do bastão na solução, haverá a hibridização da cauda poli-dA com a camada poli-dT do bastão, que, removido da solução, carrega consigo os híbridos rRNA-DNA formados. Em seguida, o bastão é submetido ao tratamento com um conjugado de anticorpos policlonais antifluoresceína marcados com peroxidase. No passo final, o bastão é introduzido na solução reveladora contendo o substrato específico para a peroxidase, havendo desenvolvimento de cor. A intensidade da cor é medida em um fotômetro portátil que acompanha o sistema GeneTrak. Esse processo todo pode ser realizado em apenas 2,5h (Sharpe, 1994).

No momento, são comercializados sistemas GeneTrak para os seguintes microrganismos:

- *Escherichia coli*: é necessário um pré-enriquecimento de dois dias, acompanhado de isolamento de colônias em agar eosina azul de metileno. Essa sonda hibridiza também com *Shigella*, o que pode ser uma vantagem ou uma desvantagem, dependendo da situação.

- *Salmonella* spp: são necessárias uma etapa de pré-enriquecimento e uma de enriquecimento seletivo, que se completam em 44h. Esse kit é o único do sistema GeneTrak que tem a aprovação final da AOAC para todos os tipos de alimentos (AOAC final action method 987.10). Todos os testes positivos devem ser confirmados pelos métodos de plaqueamento convencionais.

- *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*: é necessária uma etapa de enriquecimento em caldo LEB e plaqueamento em agar LPM.

- *Campylobacter*, *Yersinia*, *E.coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*.

Cada teste GeneTrak custa em torno de US\$ 10-12 (Sharpe, 1994).

O primeiro trabalho em que técnicas de hibridização foram utilizadas em alimentos data de 1983 (Fitts e cols., 1983). Nesse trabalho, foram utilizadas sondas radioativas para a detecção de *Salmonella* em alimentos contaminados, submetidos a pre-enriquecimento. Posteriormente, Flowers, 1985, avaliou o protótipo comercial da GeneTrak, verificando que, para a técnica ser eficiente, era necessária também uma etapa de enriquecimento seletivo. Em seguida, Flowers e cols., 1987a, demonstraram que utilizando três etapas (pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e pós-enriquecimento), em determinados tipos de alimentos, a técnica de hibridização de DNA era tão ou mais produtiva que a técnica convencional.

Em um trabalho colaborativo, conduzido por Flowers e cols., 1987b, realizado com diversos tipos de alimentos, verificou-se que o kit isotópico, empregado em alimentos submetidos a três etapas de enriquecimento, dava excelentes resultados, o que levou a AOAC a adotar o método como oficial (AOAC final action method 987.10).

Resultados considerados bons foram reportados por Emswiler-Rose e cols., 1987, em carne moída, mas um elevado índice de falso-negativos foi encontrado por St.Clair e Klenk, 1990, em carne de frango. Uma significativa redução nesse índice foi obtida pela eliminação da etapa de pré-enriquecimento (Izat e cols., 1989).

Em seguida à aprovação da técnica de hibridização de DNA empregando sondas radioativas, essa técnica foi modificada utilizando-se sondas colorimétricas tendo como alvo o RNA ribossomal dos microrganismos. Esse novo

método corresponde ao sistema GeneTrak atual, já descrito em detalhes anteriormente. Baseado em novo estudo colaborativo (Curiale e cols., 1990a) o kit GeneTrak para *Salmonella* recebeu a aprovação oficial da AOAC (AOAC final action, número de método ainda não publicado).

Trabalho semelhante, com resultados semelhantes aos de Curiale e cols., 1990a, foi publicado também por Chan e cols., 1990.

Novas sondas, mais específicas, estão sendo desenvolvidas. Assim, Tsen e cols., 1991, utilizando técnicas de clonagem molecular, prepararam uma sonda de elevada especificidade para 327 diferentes salmonelas. Cano e cols., 1992, desenvolveram um novo método de hibridização de DNA empregando sondas biotiniladas que formavam híbridos que podiam ser detectadas pela adição de um conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina.

Um dos mais importantes avanços na área de métodos rápidos em microbiologia foi a tecnologia baseada na **reação de polimerase em cadeia**, também chamada de PCR (polimerase chain reaction). Com essa técnica, desenvolvida por Saiki e cols., 1985, teoricamente é possível multiplicar um único fragmento de DNA para milhões de cópias de si mesmo em poucos minutos. A multiplicação é exponencial e se dá através da enzima DNA polimerase que, tendo um segmento de DNA como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores, denominados "primers", complementares às extremidades 3'e 5'do fragmento de DNA a ser copiado. Sintetizada a primeira cópia, o processo recomeça. O processo pode se repetir de 20 a 30 vezes, permitindo uma amplificação para até 10^5 a 10^6 cópias de cada fragmento de DNA original.

A metodologia do PCR envolve, portanto, três passos:

- 1º - denaturação do DNA com separação das duas fitas complementares, feita a 95°C por 1 minuto;
- 2º - ligação dos oligonucleotídios iniciadores, feita a 37°C por 2 minutos;
- 3º - polimerização dos oligonucleotídios com formação da fita complementar, feita a 72°C-75°C por 3 minutos.

A polimerase usada nesse sistema (Taq polimerase), extraída de uma alga denominada *Thermus aquaticus*, é termoestável, o que permite que todas essas etapas sejam realizadas em um único recipiente: basta adicionar todos os reagentes e variar apenas a temperatura. Incubadoras de alta sensibilidade e rapidíssimo ajuste de temperatura foram especialmente desenvolvidas para as técnicas de PCR.

A técnica PCR é muito poderosa, mas apresenta o inconveniente de amplificar o DNA de células mortas também, o que faz com que sua aplicação em alimentos tenha algumas limitações. Além disso, um outro problema prático é a necessidade de se ter o microrganismo adequadamente purificado. Segundo Sharpe, 1994, em alimentos o PCR deveria ser utilizado apenas para se estudar propriedades apresentadas pelos microrganismos já isolados e identificados, como fatores de virulência, e não para identificação de microrganismos. Apesar disso, verifica-se que existem muitos trabalhos relativos à aplicação da técnica PCR para detecção de alguns patógenos em alimentos, como *Listeria monocytogenes* (Wernars e cols., 1991; Fitter e cols., 1993; Wang e cols., 1993), *Vibrio vulnificus* (Hill e cols., 1991), *Clostridium botulinum* (Fach e cols., 1993), *Vibrio cholerae* (Koch e cols., 1993), *Escherichia coli* produtora de citotoxina (Gannon e cols., 1993), entre outros.

6 - Técnicas imunológicas

Após um longo período no qual as técnicas imunológicas destinadas à identificação de microrganismos estavam limitadas às técnicas de aglutinação em lâmina ou em tubo, diversos métodos imunológicos mais avançados surgiram nos últimos anos. Devido à sua alta especificidade e sensibilidade, seu emprego na área de controle microbiológico de alimentos vem aumentando.

Os métodos imunológicos são baseados em reações entre antígenos e anticorpos específicos para esses antígenos. Anticorpos monoclonais e policlonais podem ser utilizados nessas reações (Candlish, 1991; Cancro e Kienker, 1987; Notermans e Wernars, 1991).

Anticorpos policlonais correspondem a uma mistura de anticorpos, cada um produzido contra um epítipo diferente do antígeno. Cada um dos anticorpos presentes nessa mistura tem afinidade e especificidade pelo epítipo responsável por sua produção. Anticorpos policlonais são preparados através da imunização de animais com um antígeno, da retirada do sangue e da purificação do soro para remoção dos anticorpos inespecíficos.

Anticorpos monoclonais são aqueles secretados por hibridomas compostos por células híbridas resultantes da fusão de células tumorais com células secretoras de anticorpos. Para sua obtenção, efetua-se a imunização de um animal (rato ou camundongo) e posteriormente retira-se o baço. As células do baço são misturadas às células de mielomas e fundidas para a formação dos hibridomas. Em seguida, é necessário fazer a seleção do hibridoma que secreta o anticorpo desejado, fazendo-se a sua clonagem. O clone assim obtido é, portanto, uma linhagem celular capaz de produzir anticorpo em grande quantidade e de alta especificidade.

As técnicas imunológicas mais utilizadas na área de microbiologia de alimentos incluem os testes imunoenzimáticos, os de imunoimobilização e os de imunocaptura. Testes de imunofluorescência, especialmente

os destinados à pesquisa de *Salmonella*, eram utilizados no passado, mas atualmente estão praticamente abandonados.

Nas **técnicas imunoenzimáticas**, um dos reagentes fica adsorvido à superfície de uma matriz sólida (esferas de poliestireno ou de latex, placas de microtitulação, partículas metálicas revestidas de policarbonato e outras). A reação é baseada na ligação não-covalente e reversível do antígeno com o anticorpo específico, no qual um desses reagentes é marcado com uma enzima. As enzimas utilizadas com essa finalidade são, normalmente, cromogênicas, ou seja, agem em reações que resultam em desenvolvimento de cor. As enzimas mais utilizadas nesses testes são a peroxidase e a fosfatase alcalina. Para o desenvolvimento de cor, muitos substratos podem ser empregados: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolín-6-sulfônico), o-toluidina, 4-cloro-1-naftol, 3,3'-diaminobenzidina, N,N,N',N'-tetrametilbenzidina e p-nitrofenilfosfato. Substratos fluorogênicos são também empregados. A intensidade da cor desenvolvida pode ser observada visualmente ou medida com espectrofotômetros especiais.

Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos existentes, dois são mais utilizados:

a - tipo competitivo: o antígeno da amostra em teste compete com o antígeno marcado com a enzima, adicionado à mistura, pelos sítios de ligação com o anticorpo fixo na matriz sólida. A presença de antígeno na amostra em teste diminui a quantidade de antígeno marcado capaz de se ligar ao anticorpo. Consequentemente, a concentração do antígeno na amostra em teste é inversamente proporcional à intensidade de cor desenvolvida.

b - tipo não competitivo (sanduíche): para que esse teste seja possível, o antígeno deve ter pelo menos dois sítios de ligação com o anticorpo. Faz-se a adsorção do anticorpo à matriz sólida, seguido de adição da amostra em teste e de um conjugado constituído do anticorpo

marcado com a enzima. A reação é completada com a adição do substrato para essa enzima. Nesse tipo de teste, a concentração do antígeno é diretamente proporcional à intensidade de cor desenvolvida.

Os testes imunoenzimáticos são bastante empregados em microbiologia de alimentos para identificação de vários microrganismos ou toxinas, visto terem simplicidade, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem. Além disso, são passíveis de automação (Feng, 1993; Notermans e Wernars, 1991; Sharpe, 1994; Swaminathan e Konger, 1986).

Em princípio, todo microrganismo pode ser utilizado para produção de anticorpos específicos, assim como qualquer metabólito desde que imunogênico (natural ou artificialmente). Talvez sejam essas as razões que expliquem o elevado número de sistemas e kits disponíveis no mercado baseados em técnicas imunoenzimáticas.

Na lista a seguir, certamente incompleta, estão apresentados os kits comerciais baseados em testes imunoenzimáticos disponíveis no momento.

Nome do produto	fabricante	microrganismo e/ou toxina
Biopro Report	Intern. Bioproducts 3M	<i>Salmonella</i>
ELISA KIT	Rhone-Poulec	<i>Salmonella</i>
Equate	Binax	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> EIA	BioControl	<i>Salmonella</i>
Listeria EIA	BioControl	Listeria
TECRA <i>Salmonella</i>	Bio Enterprises	<i>Salmonella</i>
TECRA imunocapture	Bio Enterprises	<i>Salmonella</i>
TECRA Listeria	Bio Enterprises	Listeria
TECRA SET	Bio Enterprises	<i>S.aureus</i> (tox)
TECRA <i>B.cereus</i>	Bio Enterprises	<i>B.cereus</i>
Q.TROL	Dynatech Labs	<i>Salmonella</i>
Quik-Card	EDI-IDS	<i>Salmonella</i>
BacTrace	Kirkegaard & Perry	<i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> -TeK	Organon Teknika	<i>Salmonella</i>
Listeria-TeK	Organon Teknika	Listeria
EHEC-TeK	Organon Teknika	EHEC
SET-EIA	Bommeli	<i>S.aureus</i> (tox)
CiguaTect	Hawaii Chemtec	ciguatoxina
Aflasure B	Cambridge Life Sci.	aflatoxinas
Total aflatoxin assay	Biokits	aflatoxinas
Chemafila	Chemunex	aflatoxinas
E ₂ -screen	Environ. Diagn.	aflatoxinas
Cite-probe	IDEXX	aflatoxinas
Agri-check	IDEXX	aflatoxinas
Quantitox	May and Baker	aflatoxinas
Agri-screen	Neogen	aflatoxinas
Easi-extract TD-100	Oxoid	aflatoxinas
Ridascreen	Riedel Dehaen	aflatoxinas
Afla-5 Cup, 20 Cup	Romer Labs	aflatoxinas

Os testes imunoenzimáticos de aplicação em alimentos foram desenvolvidos nos anos 80, para detecção de *Salmonella* e *Listeria* principalmente Alguns kits empregam anticorpos monoclonais, como o *Salmonella*-TeK e Listeria-TeK, da Organon Teknika, outros usam anticorpos policlonais, como o *Salmonella* EIA e Listeria EIA, da BioControl, outros usam uma mistura dos dois tipos de anticorpos.

Alguns dos sistemas foram submetidos a estudos colaborativos para sua aprovação junto a AOAC, o que aconteceu com o *Salmonella*-TeK, que corresponde ao antigo sistema Bio-Enzabead Screen Kit posteriormente modificado (Organon-Teknika) (Curiale e cols., 1990b), com o TECRA

Salmonella Visual Immunoassay (Bio Enterprises), com o Q-TROL *Salmonella* Detection Kit (Dynatech Laboratories) e com o Report (Biotech Australia) (AOAC, 1990; June e cols., 1992).

Numerosos trabalhos tem reportado resultados sobre a eficiencia dos vários kits imunoenzimáticos para detecção de diferentes patógenos nos mais variados tipos de alimentos. Entre esses trabalhos destacam-se os de Beumer e Brinkman, 1989; Beumer e cols., 1990; Curiale e cols., 1990; Eckner e cols., 1994; Feldsine e cols., 1992, Ibrahim, 1986; June e cols., 1992; Lee e cols., 1990; Minnich e cols., 1985, entre muitos outros.

Apesar da dificuldade de analisar detalhadamente cada trabalho relacionado com testes imunoenzimáticos em alimentos devido aos seu grande número, é facil verificar que, na maioria deles, os autores constataram que os testes imunoenzimáticos tem eficiencia dependente do tipo de microrganismos procurado e do nível da contaminação. Outros fatores, como características do alimento e natureza dos anticorpos (mono ou policlonais, flagelares ou somáticos) que compõem cada teste, são igualmente importantes. Esses estudos mostram que a concentração mínima de microrganismos detectável pelos testes imunoenzimáticos gira em torno de 10^6 a 10^8 células, sendo portanto sempre necessário o enriquecimento do alimento em análise. No caso de *Salmonella*, é necessária a utilização de caldo M no enriquecimento final (6h a 8h) para favorecer a produção de flagelos e melhorar a sensibilidade da reação, uma vez que a maioria dos sistemas trabalha com anticorpos flagelares.

Há pouco tempo, foram lançados no mercado testes imunoenzimáticos totalmente automatizados. O sistema VIDAS ("VITEK Immuno Diagnostic Assay System"), de bioMerieux, França, é um instrumento baseado em reação imunoenzimática de fluorescencia, capaz de executar de forma totalmente automática todas as etapas de um teste. Cada análise é feita dentro de um módulo plástico

descartável e, dependendo da capacidade do instrumento, podem ser feitas simultaneamente 12 (Mini-VIDAS) ou 30 (VIDAS) análises. No momento, são comercializados módulos para pesquisa de *Salmonella*, de *Listeria* e de enterotoxina de *S.aureus*.

Apesar de muito recente no mercado, a utilização desse instrumento na área de alimentos está aumentando. Em estudo recentíssimo, Blackburn e cols., 1994, avaliaram a eficiência do VIDAS na detecção de *Salmonella* em alimentos natural e artificialmente contaminados, empregando ainda a técnica de imunoseparação magnética para o enriquecimento das amostras. O nível de detecção foi de $1,8 \times 10^6$ salmonelas por ml, com alguns resultados positivos causados por *Citrobacter* principalmente.

Além dos testes imunoenzimáticos, os testes de **imunoimobilização** apresentam também um grande atrativo para os microbiologistas de alimentos que necessitam de resultados mais rápidos que os obtidos pelos métodos convencionais. Nessa técnica, bactérias móveis cultivadas em meio sólido tem sua mobilidade bloqueada pela dição de anticorpos flagelares específicos, com a formação de uma banda de precipitação visível na interface bactéria-anticorpo. Esse é o princípio de funcionamento do kit *Salmonella* 1-2 Test, de BioControl Systems Inc., WA, EUA., que é apresentado, discutido e avaliado na Parte III desse trabalho.

Entre os testes baseados em técnicas imnológicas, merece destaque a **técnica de imunocaptura**, anteriormente denominada técnica de imunodifusão. Hoje essa técnica é conhecida também como técnica de imunoseparação magnética. Essas técnica baseia-se na capacidade dos microrganismos aderirem à superfície de partículas metálicas revestidas de anticorpos específicos. Uma vez obtida a ligação entre antígenos bacterianos e anticorpos, o sistema é então colocado em um concentrador que contém um imã, que atrai as partículas metálicas. O

material não ligado ao imã pode ser removido e o que sobra corresponde a um concentrado dos microrganismos procurados. Esse material concentrado pode então ser submetido a um enriquecimento ou então ser plaqueado em meios sólidos para isolamento de colônias ou ainda ser utilizado para outros procedimentos de identificação dos microrganismos presentes.

No momento, as partículas metálicas que são empregadas na técnica de imunocaptura são produzidas e comercializadas por Dynal A.S., Oslo, Noruega, sob o nome de DynabeadsTM.

Essa forma engenhosa de se promover a redução da flora acompanhante em poucos minutos permite reduzir em, no mínimo, 24h o tempo total de uma análise, uma vez que etapas de enriquecimento podem ser eliminadas.

Essa metodologia é muito recente, mas vem ganhando cada vez mais espaço entre os métodos rápidos para análise de alimentos. Skjerve e cols., 1990, foram os primeiros a utilizarem essa técnica para o isolamento de *Listeria monocytogenes* de alimentos. Em seguida, essa técnica foi utilizada por vários pesquisadores no isolamento de *Salmonella* (Luk e Lindberg, 1991; Skjerve e Olsvik, 1991; Parmar e cols., 1992; Mansfield e Forsythe, 1993) e de *Listeria* (Jackson e cols., 1993). Cudjoe e cols., 1991, empregaram essa técnica para pesquisar enterotoxina de *Clostridium perfringens* em alimentos e em fezes. Recentemente, a técnica de imunocaptura foi associada com a técnica imunoenzimática para detecção rápida de *Salmonella* em alimentos crus e processados e de *E.coli* O157:H7 em carne crua (Durham, comunicação pessoal).

7 - Métodos miniaturizados para identificação de microrganismos

Existem no comércio numerosos sistemas prontos para identificação bioquímica de microrganismos que são, em

sua maioria, miniaturizados, isto é, os testes são realizados em recipientes pequenos, contendo pequenos volumes de meio de cultura. Existem sistemas que empregam placas de microtitulação (com carreiras destacáveis ou não), galerias com pequenas câmaras, tubos divididos em compartimentos, etc. Em alguns sistemas, os meios de cultura são desidratados ou liofilizados, em outros os meios são impregnados em tiras ou discos de papel, e em outros os meios encontram-se prontos para uso.

A elaboração de uma lista razoavelmente completa dos kits de identificação é bastante difícil, devido ao seu grande número. Os kits mais conhecidos são o API (bioMerieux Vitek, Inc. EUA), que tem várias versões: enterobactérias, não fermentadores, *Listeria*, *Campylobacter* e leveduras, o MicroID (Organon Teknika Corp., NC, EUA), com versão para enterobactérias e para *Listeria*, Biolog, (Biolog Inc, CA, EUA), Enterotube (Roche Diagnostics Systems, NJ, EUA), BBL Cristal ID (Becton Dickinson Microbiology Systems, MD, EUA), MiniTek (Becton Dickinson Microbiology Systems, MD, EUA), e outros.

Vários sistemas miniaturizados são completamente automatizados (inoculação do sistema, incubação, adição de reagentes, leitura, interpretação e impressão de resultados). Entre esses destaca-se o Automicrobic System (bioMerieux-VITEK Inc., MI, EUA) para identificação de gram negativos, gram positivos, *Bacillus*, anaeróbios e leveduras, e o MicroScan (Baxter Diagnostics, Inc, CA, EUA).

De modo geral, esses kits tem um comportamento bastante satisfatório na identificação de microrganismos. Vários deles tem a aprovação da AOAC.

Numerosos trabalhos foram publicados reportando resultados de avaliação desses kits (APHAa, 1992), destacando-se Bailey e cols., 1991; Guthertz e cols., 1978, Harris e Humber, 1993; Kelly e Latimer, 1980. Enquanto nenhum kit correlaciona com outro em 100%, a reprodutibilidade deles é, provavelmente, melhor que a

dos métodos convencionais, uma vez que os fabricantes são obrigados a submeter cada lote a um eficiente controle de qualidade.

Economia de tempo, de meio de cultura e de trabalho tem um papel importante na opção por kits comerciais, devendo cada laboratório determinar qual o kit que melhor atende às suas necessidades (Sharpe, 1994).

Os sistemas miniaturizados podem ter seu emprego limitado por fatores econômicos. No entanto, sistemas miniaturizados de fabricação caseira podem ser utilizados, com resultados bastante satisfatórios. Assim, por exemplo, as invés de utilizar tubos de ensaio com meio de cultura para fazer testes bioquímicos convencionais, esses testes podem ser feitos em placas de microtitulação, com enorme economia de meio de cultura, de trabalho, espaço em bancadas, estufas, geladeiras, autoclaves, etc. Os meios de cultura são distribuídos nas placas de microtitulação, que são inoculadas a partir de uma placa-mãe. Essa inoculação pode ser feita com um inoculador de fabricação caseira, como um pedaço de madeira espetado com alfinetes. Fung tem utilizado essa técnica de forma rotineira em seu laboratório, obtendo resultados equivalentes aos obtidos pelos métodos convencionais (APHA, 1992a).

Perspectivas para o futuro

Em 1981, Jarvis fez um estudo sobre o futuro dos métodos rápidos em microbiologia de alimentos, baseado numa técnica de previsão intuitiva segundo Delphi ("Delphi's forecast"). De acordo com essa previsão, testes bioquímicos miniaturizados seriam uma realidade em 1986, técnicas automáticas de contagem e métodos rápidos para toxinas em 1991, e testes de metabolização de substratos especiais juntamente com uma base de dados a nível nacional em 1996, ficando para o ano 2001 os testes

de estimativa da atividade microbiana e uso de base de dados a nível internacional (Jarvis, 1981).

Como se pode observar pela revisão bibliográfica apresentada nesse trabalho, muitos dos itens dessa previsão foram acertados, pelo menos nos países desenvolvidos. No que diz respeito ao Brasil, verifica-se que o caminho é longo, mas lentamente essas novas técnicas começam a ser conhecidas e adotadas nas indústrias de alimentos e instituições de pesquisa. No primeiro Curso sobre Métodos Rápidos em Microbiologia realizado no Brasil em 1992, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, a maior parte dos sistemas apresentados eram desconhecidos pela grande maioria dos participantes do curso. Entretanto, por ocasião dos Segundo Curso sobre Métodos Rápidos em Microbiologia, realizado no mesmo local um ano após, vários equipamentos já eram conhecidos e muitos deles já eram utilizados nas indústrias, universidades e outras instituições, conforme demonstrou um questionário respondido pelos participantes. A previsão de Delphi necessita, portanto, da adição de, pelo menos, 10 a 15 anos para que seja válida também para Brasil.

Resumo

Essa parte do trabalho corresponde a uma revisão dos principais métodos rápidos de interesse em microbiologia de alimentos. Os métodos rápidos, apresentados nesse estudo, foram agrupados em 7 categorias: 1 - técnicas envolvidas com o preparo do material necessário para uma análise microbiológica; 2 - técnicas de microscopia; 3 - métodos alternativos para contagem de microrganismos viáveis; 4 - técnicas indiretas para enumeração de microrganismos viáveis; 5 - técnicas genéticas; 6 - técnicas imunológicas; 7 - métodos miniaturizados para identificação de microrganismos.

Summary

A review on rapid methods in food microbiology is presented. They were classified in 7 main categories: 1 - methods involved with sample preparation; 2 - microscopy methods; 3 - new methods for plating and counting; 4 - indirect methods for viable counting; 5 - genetic techniques; 6 - immunological methods; 7 - miniaturized procedures for identification of microorganisms.

Parte II

Avaliação do sistema Petrifilm para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em alimentos

Introdução

Na década passada, vários novos métodos e sistemas foram desenvolvidos como alternativas para os métodos convencionais de contagem de microrganismos indicadores de higiene em alimentos. Um dos mais engenhosos é, certamente, o sistema Petrifilm, inicialmente desenvolvido para contagem de bactérias aeróbias totais e posteriormente diversificado para outros grupos de microrganismos.

O sistema Petrifilm é constituído de cartões de papel grosso, do tamanho dos cartões de crédito, revestidos de meio de cultura desidratado contendo corantes indicadores e agentes gelificantes hidrossolúveis. Cada cartão, chamado genericamente de "placa Petrifilm", é recoberto por uma película plástica transparente removível, que tem na face interna voltada para a placa, um gel hidrossolúvel e um corante indicador, conforme indicado na figura 1.

Figura 1.

As placas Petrifilm são comercializadas prontas para uso, isto é, basta levantar a película plástica, transferir 1ml do inóculo (alimento homogeneizado em diluente adequado), voltar a película plástica para a posição original e, finalmente, pressionar o inóculo com um molde difusor plástico para distribuí-lo uniformemente pela placa de maneira a formar uma área circular de cerca de 20 · cm². Em seguida, basta incubar as placas na temperatura e tempo adequados e enumerar as colônias presentes (figura 2).

Figura 2. Inoculação de uma placa Petrifilm

O princípio de funcionamento das placas Petrifilm é bastante simples: a água do inóculo reconstitue o meio de cultura desidratado e solubiliza os agentes gelificantes presentes na placa e na película plástica. Após cerca de 1 minuto, o meio de cultura gelifica e as placas podem então ser incubadas, sempre em posição horizontal e com a superfície transparente para cima. Devido aos corantes indicadores presentes no meio, as colônias que se

desenvolvem são coloridas. A contagem das colônias pode ser feita manualmente ou utilizando-se um contador Quebec. Para facilitar a contagem, as placas Petrifilm são quadriculadas, contendo 20 quadrados de 1 cm² de área cada. Caso seja necessário submeter as colônias a testes posteriores, basta levantar a película transparente e repicar as colônias (figura 3).

Figura 3. Repicagem de colônias de uma placa Petrifilm

No momento, são comercializadas placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais, de coliformes totais e *Escherichia coli* e de bolores e leveduras. As placas Petrifilm para coliformes totais também podem ser utilizadas para contagem de coliformes fecais, variando apenas a temperatura de incubação. As placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais podem ser utilizadas para contagem de bacterias lácticas, variando apenas o diluente utilizado para homogeneização do alimento em análise. Existe também um sistema especial para contagem de *E.coli* O147:H7, importante microrganismo

patogênico em alimentos em muitos países como Estados Unidos e Canadá.

As placas Petrifilm são produzidas pela 3M Co., St. Paul, MN, Estados Unidos, e comercializados no Brasil pela 3M do Brasil Ltda.

As placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais são constituídas de agar padrão para contagem desidratado, agentes gelificantes e um corante indicador tetrazólico para facilitar a contagem das colônias. Após a inoculação conforme já descrito, a incubação é feita a 35°C por 48+/-2h. As colônias tem coloração vermelha. A contagem não deve exceder 250 colônias por placa. Quando o número de colônias é superior a esse valor, recomenda-se que se faça uma estimativa, enumerando-se as colônias em um número representativo de quadrados e multiplicando pelo número apropriado para se obter a contagem estimada em 20 quadrados, ou seja, 20 cm². A figura 4 apresenta um exemplo de placa Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais contendo 143 colônias.

Figura 4. Placa Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais contendo 143 colônias

As placas Petrifilm para contagem de coliformes são constituídas de agar violeta bile vermelho fenol desidratado, agentes gelificantes e corante tetrazólico. A incubação dessas placas é feita a 35°C por 24+/-2h. As colônias de coliformes são de coloração vermelha, apresentando bolhas de gás aprisionado à sua volta, devido à fermentação da lactose. Colônias sem gás não são consideradas coliformes. De acordo com o fabricante, o número adequado de colônias para contagem é 150 por placa. Contagens estimadas podem ser feitas quando o número de colônias ultrapassar 150. Para isso, o número de colônias em um número representativo de quadrados deve ser determinado e multiplicado pelo número apropriado para se obter a contagem correspondente a 20 quadrados, ou seja, 20 cm². A figura 5 mostra uma placa Petrifilm para contagem de coliformes totais, contendo 79 colônias.

Figura 5. Placa Petrifilm para coliformes totais contendo 79 colônias.

As placas Petrifilm para contagem de coliformes fecais são as mesmas de contagem de coliformes totais, mas a incubação deve ser feita a 44°C por 24+/-2h. Nesse caso, recomenda-se que as placas, para serem incubadas, sejam colocadas dentro de um recipiente que mantenha sua umidade. A contagem de colônias se processa de forma idêntica ao sistema anteriormente descrito.

As placas Petrifilm para contagem de *E.coli* contém agar violeta bile vermelho fenol desidratado, agentes gelificantes e um indicador glucuronidásico (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronídeo) para identificação de *E.coli*. Nessas placas é também possível fazer a contagem de coliformes totais. Os coliformes fermentam a lactose do meio produzindo gás, que é aprisionado em volta da colônia. *E.coli*, por sua vez, produz glucuronidase, que reage com o indicador formando um precipitado azul em volta da colônia, permitindo sua identificação visual. A temperatura de incubação dessas placas varia de acordo com a natureza do alimento em análise: 32°C para leite e derivados, e 35°C para os demais alimentos. As placas Petrifilm devem ser incubadas por 24+/-2h e então ser examinadas quanto à presença de coliformes e de *Escherichia coli*. Recomenda-se incubação por mais 24+/-2h para a contagem definitiva de *E.coli*. Para contagem de coliformes considera-se todas as colônias vermelhas com gás, e para contagem de *E.coli* apenas as colônias de coloração azul, com ou sem gás. Colônias vermelhas sem gás não são consideradas coliformes. Em placas onde o número de coliformes ou de *E.coli* é superior a 150, o número definitivo de colônias pode ser estimado de forma similar à já descrita anteriormente. A figura 6 apresenta uma placa Petrifilm para contagem de *E.coli*, contendo 213 colônias de coliformes e 114 de *E.coli*.

Figura 6. Placa Petrifilm para contagem de *E.coli*, contendo 213 colônias de coliformes e 114 de *E.coli*.

As placas Petrifilm para contagem de bolores e leveduras contem agar Sabouraud suplementado com glicose, antibióticos (clortetraciclina e cloranfenicol) e um indicador de atividade fosfatásica. Toda célula viável produz fosfatase, e na presença dessa enzima, o indicador é ativado corando as colônias de bolores e leveduras de azul. A semeadura é feita de maneira idêntica à descrita para os sistemas anteriores, mas o inóculo deve ser espalhado por uma superfície maior (30 cm²), o que é obtido com o uso de um difusor plástico apropriado. A incubação dessas placas é feita entre 20°C e 25°C, com exame das placas a cada 24h. A leitura final é obtida com 5 dias de incubação. As colônias de leveduras tem coloração azul esverdeado ou esbranquiçado e são pequenas com contornos bem nítidos. As colônias de bolores tendem a ser maiores e mais difusas que as de leveduras, podendo

apresentar diversas colorações além da azul, devido aos pigmentos naturais que podem produzir (pretas, amarelas, verdes, etc). Devem ser contadas placas com até 150 colônias. Contagens estimadas podem ser obtidas através da contagem de colônias em um número representativo de quadrados, multiplicando-se pelo número apropriado para se obter o valor equivalente a 30 quadrados (30cm²). A figura 7 apresenta três placas Petrifilm para contagem de bolores e leveduras: a primeira contém apenas leveduras (44 colônias), e segunda apenas bolores (27 colônias).

Figura 7. Placas Petrifilm para bolores e leveduras contendo: a - apenas leveduras (44 colônias), b - apenas bolores (27 colônias)

As placas Petrifilm para contagem de bactérias lácticas homo e heterofermentativas são as mesmas da contagem de bactérias aeróbias totais, mas para o preparo das amostras para análise o diluente a ser empregado deve o caldo MRS, que é seletivo para bactérias produtoras de ácido láctico. Após a transferência do caldo MRS contendo

a amostra de alimento para as placas Petrifilm, a incubação é feita em anaerobiose por 48 ± 2 h a $30-35^\circ\text{C}$. As colônias de bactérias lácticas são de coloração vermelha ou marrom avermelhado, podendo ou não apresentar bolhas de gás. As bactérias lácticas homofermentativas não são produtoras de gás, enquanto as heterofermentativas são aerogênicas. A figura 8 apresenta uma placa Petrifilm contendo 60 colônias de bactérias lácticas.

Figura 8. Placa Petrifilm para bactérias lácticas contendo 60 colônias.

As placas Petrifilm para contagem de coliformes tem uma variante chamada "placa de alta sensibilidade para contagem de coliformes", que é idêntica à placa comum de contagem de coliformes mas permite a inoculação de 5ml de homogeneizado de alimento, que deve ser espalhada em uma superfície maior (30cm^2). As condições de incubação e de contagem das colônias são as mesmas da placa Petrifilm comum para contagem de coliformes.

Resultados obtidos em vários estudos colaborativos inter-laboratoriais permitiram que as placas Petrifilm recebessem as seguintes aprovações oficiais da AOAC (Association of Official Analytical Chemists, EUA):

- leite cru e leite pasteurizado: contagem de bactérias aeróbias totais e coliformes totais: AOAC final action method 986.33.
- laticíneos: contagem de bactérias aeróbias totais e coliformes totais: AOAC final action method 989.10.
- todos os alimentos: contagem de bactérias aeróbias totais: AOAC first action method 990-12. Coliformes totais e *E.coli*: AOAC first action method 991.14.

As placas Petrifilm tem ainda a aprovação da Associação Americana de Saúde Pública, além de órgãos oficiais de vários outros países como França, Austrália, Alemanha, Bélgica, Finlândia, Suécia, e de órgãos internacionais com IDF (Federação Internacional de Laticíneos) e NMKL (Comitê de Alimentos dos Países Nórdicos).

Além dos estudos colaborativos realizados com o propósito de tornar a metodologia oficial, a literatura científica internacional tem muitos trabalhos envolvendo a utilização dos vários tipos de placas Petrifilm para diferentes alimentos (Nelson e cols., 1984; Smith e cols., 1985; Ginn e cols., 1986; McGoldrick e cols., 1986; Senyk e cols., 1987; Bailey e Cox, 1987; McAllister e cols., 1987; Restaino e Lyon, 1987; Bishop e Juan, 1988; Byrne e cols., 1989; McAllister e cols., 1988; Curiale e cols., 1989; Smith e cols., 1989; Abgrall e Cleret, 1990; Beuchat e cols., 1990; Curiale e cols., 1990; Ingham e Moody, 1990; Matner e cols. 1990; Okrend e cols., 1990; Barnard e cols., 1991; Beuchat e cols., 1991; Byrne e Bishop, 1991; Chain e Fung, 1991; Curiale e cols., 1991; Piton e Grappin, 1991; Ellender e cols., 1993; Cormier e cols., 1993; Wakabayashi e Miyao, 1993).

Uma análise cuidadosa dos trabalhos permite verificar que a metodologia Petrifilm não é uma metodologia rápida no sentido de fornecimento mais rápido de resultados quando comparado aos métodos de plaqueamento convencionais. Fica, no entanto, evidente que a metodologia Petrifilm se constitui num método de execução rápida, com a vantagem de ser facilmente realizada e dispensar o uso de equipamentos laboratoriais especiais.

Apesar da abundante literatura relativa ao sistema Petrifilm em muitos países, ele é ainda pouco conhecido no Brasil. Com o início da comercialização do sistema Petrifilm no Brasil em 1993 e sua rápida adoção por muitas indústrias alimentícias brasileiras, torna-se importante fazer um estudo da adequacidade desse sistema em nossas condições de trabalho e em nossos alimentos. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de contribuir com dados novos, trabalhando-se com alimentos de origem animal e vegetal, que foram submetidos à enumeração de bactérias aeróbias totais, coliformes totais e bolores e leveduras, utilizando-se simultaneamente as placas Petrifilm e os métodos convencionais de contagem recomendados pelo BAM/AOAC, 1992, que são aqueles mais utilizados nos laboratórios de microbiologia de alimentos de nosso país.

Material e métodos

Amostras de alimentos: foram analisadas 63 amostras de alimentos, adquiridas ao acaso no comércio da cidade de São Paulo. Os alimentos estudados foram assim agrupados:

- carne e derivados: 24 amostras (10 de linguiça crua de porco, 6 de carne bovina crua, 2 de carne de frango crua, 2 de presunto cozido, 1 de linguiça crua de frango, 1 de mortadela, 1 de salsicha e 1 de kibe para fritar;

- leite pasteurizado: 11 amostras (6 do tipo B e 5 do tipo C);
- queijos: 18 amostras (5 de queijo parmesão, 4 de queijo Minas, 4 de muzzarela, 3 de ricota e 2 de queijo prato;
- vegetais crus: 10 amostras (alface).

Com exceção das amostras de alface, todas as demais amostras foram transportadas ao laboratório em recipientes de isopor contendo gelo reciclável e analisadas no mesmo dia da coleta.

Preparo das amostras para análise: 25g de caga produto foram pesados assepticamente em um saco plástico estéril e homogeneizados com 225ml de tampão fosfato de Butterfield, pH 7,2, utilizando-se o Stomacher (Seward Medical Ltd., Londres, Inglaterra). Em seguida, foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-6} , utilizando-se o mesmo tampão. No caso de leite pasteurizado, a etapa de homogeneização no Stomacher não foi realizada.

Contagem de bactérias aeróbias totais nas placas Petrifilm: Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas Petrifilm para bacterias aeróbias totais, procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 35°C por 24+/-2h e por 48+/-2h, procedeu-se a contagem de colônias, realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Contagem de bactérias aeróbias totais, seg. BAM/AOAC 1992: Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas de Petri estéreis vazias, às quais se adicionou 10-12ml de agar padrão para contagem (Oxoid). Após homogeneização do inóculo com o meio de cultura e a

solidificação do agar, as placas foram incubadas a 35°C por 24+/-2h e por 48+/-2h, efetuando-se a contagem de colônias com o auxílio de um contador. A contagem foi realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Contagem de coliformes totais nas placas Petrifilm:

Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas Petrifilm para coliformes totais, procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 35°C por 24+/-2h e por 48+/-2h, procedeu-se a contagem de colônias, realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Contagem de coliformes totais seg. BAM/AOAC, 1992:

Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas de Petri vazias às quais se adicionou 10-12ml de agar violeta bile vermelho fenol (Oxoid). Após homogeneização e solidificação do agar, adicionou-se a cada placa cerca de 5ml de agar violeta bile vermelho fenol, para formar uma sobrecamada. Em seguida, procedeu-se a incubação, feita a 35°C por 24+/-2h e por 48+/-2h, quando as colônias características de coliformes foram enumeradas. A contagem foi realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Contagem de bolores e leveduras nas placas Petrifilm:

Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas Petrifilm para bolores e leveduras, procedendo-se de acordo com as instruções do fabricante. Durante a incubação a 20-25°C, as placas foram observadas diariamente fazendo-se contagem após 3 dias e 5 dias. A contagem de colônias foi realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 15 e 150 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Contagem de bolores e leveduras seg. BAM/AOAC, 1992:

Transferiu-se 1ml de cada diluição da amostra em análise para placas de Petri vazias às quais se adicionou 10-12ml de agar dextrose batata (Oxoid) acidificado com ácido tartárico a 10% até pH 3,5. Após homogeneização do inóculo com o meio de cultura e a solidificação do agar, as placas foram incubadas a 20-25°C, com observação diária e contagem de colônias após 3 dias e 5 dias. A contagem de colônias foi realizada por dois analistas diferentes, sendo os resultados registrados separadamente. Para a contagem, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 15 e 150 colônias. O resultado para cada amostra foi obtido multiplicando-se a contagem obtida pelo inverso da diluição correspondente.

Avaliação dos resultados: Com as contagens transformadas em logaritmo de base 10, calculou-se as médias aritméticas dos resultados obtidos pelos dois analistas. Essas médias foram submetidas à análise estatística, aplicando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon, com $\alpha=0,5\%$ (Siegel, 1975).

Resultados e Discussão

Na tabela 1 (pag. 61) estão apresentadas as contagens de bactérias aeróbias totais nos 63 produtos analisados, obtidas nas placas Petrifilm, utilizadas da forma recomendada pelo fabricante, e os obtidos no método convencional BAM/AOAC, 1992. Nessa tabela estão apresentados os valores mínimos, máximos e médios das contagens obtidas para cada grupo de alimento analisado.

Na tabela 2 (pag. 62) estão apresentados os resultados da contagem de coliformes totais nos 63 produtos analisados, obtidas nas placas Petrifilm, utilizadas da forma recomendada pelo fabricante, e os obtidos no método convencional BAM/AOAC, 1992. Também nessa tabela estão apresentados os valores mínimos, máximos e médios das contagens obtidas para cada grupo de alimento analisado. É importante ressaltar que, das 63 amostras analisadas, foram considerados válidos os resultados apresentados por 32 amostras. As demais não foram consideradas ou porque apresentaram resultados estimados ou porque o número de colônias na placa correspondente à menor diluição efetuada era inferior a 25.

A tabela 3 (pag. 63) apresenta os resultados relativos às contagens de bolores e leveduras obtidas nas placas Petrifilm e os obtidos no método convencional BAM/AOAC, 1992, ambos com 5 dias de incubação. Como já feito nas tabelas anteriores, estão incluídos nessa tabela os valores mínimos, máximos e médios das contagens obtidas para cada grupo de alimento analisado. Entre as 63 amostras de alimentos estudados, 28 não apresentaram colônias de bolores e leveduras na placa correspondente à primeira diluição plaqueada. Essas amostras, portanto, não foram consideradas na análise estatística.

Na tabela 4 (pag. 64) estão apresentados os resultados referentes à análise estatística dos dados descritos nas tabelas 1, 2 e 3. Nessa tabela pode ser

verificada a existência ou não de equivalência entre os métodos avaliados.

Embora a metodologia Petrifilm não possa ser considerada um método rápido, pelo menos não no sentido de fornecimento rápido de resultados, as leituras de bactérias aeróbias totais foram feitas com 24h de incubação, além da leitura de 48h recomendada pelo fabricante. Os resultados dessas contagens estão apresentados na tabela 5 (pag. 65), assim como a interpretação estatística desses resultados.

Da mesma forma, as contagens de bolores e leveduras realizadas nas placas Petrifilm foram feitas também com 3 dias de incubação, além da leitura final de 5 dias recomendada pelo fabricante. Os resultados desse estudo, bem como a interpretação estatística, estão apresentados na tabela 6 (pag 66).

Analisando-se os resultados apresentados nas tabelas 5 e 6 verifica-se que, em quase todos os produtos testados, as leituras nas placas Petrifilm para bactérias aeróbias totais com 24h de incubação foram inferiores às leituras obtidas com 48h de incubação. O mesmo aconteceu na contagem de bolores e leveduras obtidas com 3 dias e com 5 dias de incubação. Esses resultados levantaram a suspeita de que também as contagens de coliformes totais, quando feitas com 48h de incubação, forneceriam resultados superiores àqueles obtidos após as 24h de incubação recomendadas pelo fabricante. Para esclarecer essa suspeita, submeteu-se os resultados de contagens de coliformes totais feitas com 24h e com 48h de incubação à análise estatística, e o resultado dessa análise está apresentado na tabela 7 (pag. 67). Ao analisar os resultados dessa tabela, surgiu a dúvida de que a diferença observada teria ocorrido também no método convencional de plaqueamento. A resposta para essa dúvida pode ser vista na tabela 8 (pag. 68).

Tabela 1. Contagens de bactérias aeróbias totais em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm e no método convencional BAM/AOAC

	número de amostras		Petrifilm 48h			BAM/AOAC 48h		
	analisadas	com resultado válido	n	N	$\bar{N}$	n	N	$\bar{N}$
carne e derivados	24	24	5,40	8,23	6,86	5,67	8,32	7,05
leite pasteurizado	11	11	2,43	3,88	3,29	2,86	4,20	3,65
queijos	18	18	6,15	8,64	7,39	6,08	8,70	7,60
vegetal	10	10	5,00	7,48	6,55	5,42	7,60	6,51
todos os alimentos	63	63	2,43	8,64	6,33	2,86	8,70	6,46

n = log contagem mais baixa N = log contagem mais alta $\bar{N}$ = log contagem média

Tabela 2. Contagens de coliformes totais em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm e no método convencional BAM/AOAC

	número de amostras		Petrifilm 24h			BAM/AOAC 24h		
	analisadas	com resultado válido	n	N	$\bar{N}$	n	N	$\bar{N}$
carne e derivados	24	12	2,46	4,81	3,43	2,30	5,04	3,97
leite pasteurizado	11	0	< 0	-	-	< 0	-	-
queijos	18	9	2,48	7,11	4,14	2,42	7,43	4,32
vegetal	10	10	2,56	5,60	3,24	3,50	5,89	5,02
todos os alimentos	63	31	2,61	7,11	3,57	2,30	7,43	4,41

n = log contagem mais baixa N = log contagem mais alta $\bar{N}$ = log contagem média

Tabela 3. Contagens de bolores e leveduras em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm e no método convencional BAM/AOAC

	número de amostras		Petrifilm 5 d			BAM/AOAC 5 d		
	analisadas	com resultado válido	n	N	$\bar{N}$	n	N	$\bar{N}$
carne e derivados	24	9	1,93	4,85	4,13	2,00	5,20	4,04
leite pasteurizado	11	0	< 0	-	-	< 0	-	-
queijos	18	16	3,97	7,78	5,82	3,65	7,52	5,51
vegetal	10	10	3,72	4,89	4,45	2,77	4,85	4,06
todos os alimentos	63	35	1,93	7,78	4,99	2,00	7,52	4,72

n = log contagem mais baixa N = log contagem mais alta $\bar{N}$ = log contagem média

Tabela 4. Análise estatística dos resultados obtidos nas contagens de bactérias aeróbias totais, coliformes totais e bolores e leveduras em alimentos, obtidos nas placas Petrifilm e no método convencional BAM/AOAC

	aeróbios totais	coliformes totais	bolores e leveduras
carne e derivados	PF 48h = BAM/AOAC 48h	PF 24h = BAM/AOAC 24h	PF 5d = BAM/AOAC 5d
leite pasteurizado	PF 48h = BAM/AOAC 48h	N.S.A.	N.S.A.
queijos	PF 48h = BAM/AOAC 48h	PF 24h = BAM/AOAC 24h	PF 5d = BAM/AOAC 5d
vegetal	PF 48h = BAM/AOAC 48h	PF 24h < BAM/AOAC 24h	PF 5d = BAM/AOAC 5d
todos os alimentos	PF 48h = BAM/AOAC 48h	PF 24h < BAM/AOAC 24h	PF 5d = BAM/AOAC 5d

N.S.A. = não se aplica

Tabela 5. Contagens de bactérias aeróbias totais em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm incubadas por 24h e por 48h.

	24h	48h	análise estatística ($\alpha = 0.05\%$)
carne e derivados	6,67	6,86	PF 24h < PF 48h
leite pasteurizado	2,50	3,29	PF 24h < PF 48h
queijos	6,30	7,39	PF 24h < PF 48h
vegetal	5,90	6,55	PF 24h < PF 48h
todos os alimentos	5,93	6,33	PF 24h < PF 48h

Tabela 6. Contagens de bolores e leveduras em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm incubadas por 3 d e 5 d.

	3 d	5 d	análise estatística ($\alpha = 0.05\%$)
carne e derivados	3,88	4,13	PF 3d < PF 5d
leite pasteurizado	N.S.A.	N.S.A.	N.S.A.
queijos	5,67	5,82	PF 3d < PF 5d
vegetal	4,26	4,45	PF 3d < PF 5d
todos os alimentos	4,80	4,90	PF 3d < PF 5d

N.S.A. = não se aplica

Tabela 7. Contagens de coliformes totais em alimentos, obtidas nas placas Petrifilm incubadas por 24h e por 48h.

	24h	48h	análise estatística ($\alpha = 0.05\%$)
carne e derivados	3,47	3,49	PF 24h < PF 48h
leite pasteurizado	N.S.A.	N.S.A.	N.S.A.
queijos	4,14	4,20	PF 24h = PF 48h
vegetal	3,24	3,37	PF 24h < PF 48h
todos os alimentos	4,80	4,90	PF 24h < PF 48h

N.S.A. = não se aplica

Tabela 8. Contagens de coliformes totais em alimentos, obtidas no método convencional BAM/AOAC, com incubação por 24h e 48h.

	24h	48h	análise estatística ($\alpha = 0.05\%$)
carne e derivados	3,97	4,04	BAM/AOAC 24h < BAM/AOAC 48h
leite pasteurizado	N.S.A.	N.S.A.	N.S.A.
queijos	4,32	4,36	BAM/AOAC 24h = BAM/AOAC 48h
vegetal	5,02	5,23	BAM/AOAC 24h < BAM/AOAC 48h
todos os alimentos	4,41	4,52	BAM/AOAC 24h < BAM/AOAC 48h

N.S.A. = não se aplica

Os resultados aqui obtidos indicaram que as médias das contagens para bactérias totais (tabela 1), coliformes totais (tabela 2) e de bolores e leveduras (tabela 3) nos 4 grupos de alimentos analisados foram bastante próximas. Conforme apresentado na tabela 4, a análise estatística desses dados permitiu concluir que, para carnes e derivados, leite pasteurizado e queijos houve equivalência dos resultados obtidos pelos dois métodos comparados, tanto para bactérias aeróbias totais, quanto para coliformes totais e bolores e leveduras. No caso de vegetais, essa equivalência foi observada para bactérias aeróbias totais e bolores e leveduras, não acontecendo, no entanto, para coliformes totais.

Embora realizado com um número de amostras de alimentos não tão grande quanto aquele da maioria dos trabalhos publicados a respeito do sistema Petrifilm, o presente estudo forneceu resultados que confirmaram muitos dos resultados anteriormente relatados.

Em um dos primeiros trabalhos de avaliação do sistema Petrifilm, Nelson e cols., 1984, ao trabalharem com 120 amostras de leite cru, reportaram que as contagens de coliformes obtidas pelo sistema Petrifilm foram comparáveis àsquelas obtidas através de plaqueamento em agar violeta bile vermelho fenol, porém foram inferiores àsquelas obtidas pela técnica convencional dos tubos múltiplos. Nesse estudo, os autores observaram a vantagem das placas Petrifilm de fornecerem resultados em 24h, em oposição à técnica dos tubos múltiplos que fornecem resultados após vários dias. Resultados idênticos com leite cru foram relatados por Gill e cols., 1984.

Smith e cols., 1985, também observaram boa correlação entre os resultados de contagens de bactérias aeróbias totais em carne moída crua obtidas nas placas Petrifilm e nas placas convencionais.

Em 1986, no estudo colaborativo de comparação do método Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais e de coliformes em leite cru e pasteurizado com os

métodos tradicionais de contagem em placas, utilizando agar padrão para contagem e agar violeta bile vermelho fenol, respectivamente, realizado por onze laboratórios americanos simultaneamente, verificou-se que os resultados obtidos pelos dois métodos foram equivalentes (Ginn e cols., 1986). Com esse estudo, as placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais e de coliformes em leite cru e leite pasteurizado receberam a aprovação da AOAC (AOAC Official Final Action, method 986.33).

Em 1987, Senyk e cols., 1987, empregaram as placas Petrifilm para fazer contagem total de bactérias aeróbias, de bactérias psicrotróficas e de coliformes em leite pasteurizado integral desnatado, armazenado refrigerado até 14 dias. Esses autores observaram que os logaritmos das contagens médias obtidas pelo método convencional de plaqueamento eram significativamente mais elevadas que aquelas obtidas nas placas Petrifilm nas amostras testadas após 0, 7 e 14 dias de armazenamento a 6,10C. Os autores consideraram que, no que dizia respeito à contagem de bactérias aeróbias totais e de psicrotróficas, a diferença nas contagens era causada pela melhor capacidade de reversão da injúria bacteriana causada pela pasteurização quando o agar convencional era utilizado. Os autores consideraram também que no estudo colaborativo que resultou na aprovação do método Petrifilm pela AOAC, as amostras de leite haviam sido experimentalmente contaminadas e imediatamente distribuídas aos laboratórios participantes para a análise. Essa situação caracterizava uma situação irreal, diferente daquela em que os microrganismos já estão presentes no leite cru e são submetidos à injúria pelo processo de pasteurização. Essa injúria seria mais intensa nas bactérias psicrotróficas. Em relação aos coliformes estudados, esses autores observaram que a comparação dos dois métodos não foi bem sucedida, devido ao pequeno número de coliformes presentes nas amostras estudadas.

McAllister e cols., 1987, publicaram um trabalho relatando também resultados de contagem de bactérias totais em leite pasteurizado, ressaltando como principal vantagem das placas Petrifilm em relação a outros métodos de contagem, o fato das colônias serem mais facilmente visualizadas devido à presença do indicador tetrazólico.

Bailey e Cox, 1987, avaliaram o sistema Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais e de coliformes na determinação da qualidade microbiológica de carcaças de frango. Esses autores observaram que, na determinação do número de bactérias aeróbias totais, a correlação dos resultados obtidos pelo sistema Petrifilm e aqueles obtidos pelo método convencional era muito alta, mas para coliformes o sistema Petrifilm não funcionava adequadamente em frangos porque coliformes representavam menos de 10% do total da flora, o que causava grande interferência nas contagens, com grande dificuldade de visualização das bolhas de gás aprisionadas ao redor das colônias nas placas Petrifilm.

Resultados semelhantes aos de Bailey e Cox, 1987, relativos à dificuldade de enumeração de coliformes na presença de flora acompanhante muito abundante foram relatados por Restaino e Lyon, 1987, ao trabalhar com carne moída crua congelada.

McAllister e cols., 1988, analisaram amostras obtidas em uma usina processadora de frangos e derivados notando excelente correlação entre resultados obtidos nas placas Petrifilm para bactérias aeróbias totais e aqueles obtidos pelo método de plaqueamento tradicional. Devido à baixa frequência de coliformes nessa usina, os resultados obtidos pelos dois métodos não puderam ser comparados satisfatoriamente.

Smith e cols., 1989, reportaram resultados referentes ao emprego de placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais e coliformes totais em alimentos congelados. Esse estudo foi desenvolvido com mixes para sobremesas, sabor baunilha, contendo variados teores de gordura e de sólidos totais, artificialmente

contaminados. Verificou-se que as contagens de coliformes obtidas nas placas Petrifilm foram inferiores aos obtidos no método convencional de plaqueamento. Os resultados referentes à bactérias totais foram considerados insatisfatórios porque menos de 10% das amostras investigadas apresentavam colônias contáveis. Nesse estudo foram também analisadas amostras de sobremesas lácteas congeladas adquiridas no comércio e nesses produtos as duas determinações deram resultados equivalentes aos obtidos pelos métodos convencionais. Não há no trabalho comentários sobre as possíveis causas da diferença de resultados nos dois tipos de produtos estudados.

Em 1989, sob coordenação de Curiale e cols., 1989, desenvolveu-se novo estudo colaborativo, desta vez para comparar resultados de contagem de bactérias aeróbias totais e coliformes totais em laticíneos, obtidos através de placas Petrifilm e através do plaqueamento convencional, com a finalidade de se obter a aprovação do método junto à AOAC. Cinco produtos lácteos (leite achocolatado, queijo pasteurizado, leite em pó desnatado, leite evaporado e sorvete de baunilha) foram inoculados com diferentes concentrações de bactérias totais aeróbias e de coliformes e analisados simultaneamente por onze laboratórios nos Estados Unidos. Para a maioria dos produtos lácteos estudados, as placas Petrifilm detectaram números mais elevados de coliformes que os detectados pelo método de plaqueamento convencional em agar violeta bile vermelho fenol, mas a reprodutibilidade dos dois métodos foi a mesma. Na maioria das amostras estudadas, os resultados para contagem de bactérias totais foram os mesmos nos dois métodos de contagem utilizados. Em vista desses resultados, as metodologias de contagem de bactérias aeróbias totais e de coliformes totais em laticíneos empregando placas Petrifilm foram aprovados definitivamente pela AOAC (AOAC Official Final Action, method 989.10).

As placas Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais foram utilizadas por Abgrall e Cleret, 1990, para enumeração da flora aeróbia de pescados. Esse estudo tem resultados bastante curiosos: na determinação do número de bactérias viáveis em carne de peixe recém abatido, as placas Petrifilm deram resultados significativamente superiores ($p > 0,001$) aos obtidos pelo método de plaqueamento convencional em agar padrão para contagem, o que não aconteceu quando filés de peixe foram estudados. Essa diferença foi devida à presença da bactéria marinha *Photobacterium phosphorum*, que cresceu nas placas Petrifilm mas não conseguiu crescer nas placas de agar padrão de contagem suplementado com 3,5% de NaCl. Quando o peixe é filetado, essa bactéria marinha desaparece, pois a flora natural, de origem marinha, é substituída pela flora proveniente da manipulação do pescado.

Em 1990, novamente sob coordenação de Curiale e cols., 1990, realizou-se mais um estudo colaborativo para comparar resultados obtidos utilizando placas Petrifilm e aqueles obtidos por metodologia convencional, desta vez trabalhando-se com 6 tipos de alimentos diversos: farinhas (trigo, trigo integral e centeio), nozes, camarão cru, condimentos (pimenta do reino, cebola em pó e tomilho), carne de peru moída e congelada e vegetais (cogumelos frescos, cenoura congelada e ervilhas congeladas). Esses alimentos foram selecionados de forma a se ter uma boa representatividade de fatores que poderiam interferir na eficiência dos métodos, ou seja, presença de partículas que mascaram as colônias, presença de microrganismos que liquefazem os agentes gelificantes das placas Petrifilm, contaminação elevada com bolores e presença de microrganismos que crescem espalhando-se pelas placas causando o fenômeno chamado "swarming". Os resultados obtidos indicaram boa correlação entre os métodos, e o sistema Petrifilm para contagem de bactérias aeróbias totais para todos os tipos de alimentos recebeu

aprovação inicial da AOAC ((AOAC official first action, method 990.12)).

O último estudo colaborativo publicado é referente à validação de placas Petrifilm para contagem de coliformes totais e *E.coli* em todos os alimentos (Curiale e cols., 1991). Participaram desse estudo 14 laboratórios americanos que fizeram a enumeração de coliformes e de *E.coli* em farinhas, nozes, queijos, carne cozida com molho, cogumelos frescos e carne crua de peru, artificialmente contaminados. Os resultados obtidos nas placas Petrifilm e na técnica do número mais provável (NMP) foram considerados comparáveis, sendo a reprodutibilidade da técnica Petrifilm tão boa ou até melhor que a observada na técnica NMP. Esse estudo resultou na aprovação da AOAC (AOAC first action, method 991.14).

Em 1991, Piton e Grappin, realizaram uma avaliação das placas Petrifilm para contagem da flora aeróbia mesófila total e dos coliformes em leite cru, coletado em usinas processadoras de leite, pois consideraram que os estudos realizados até então haviam sido feitos com amostras artificialmente contaminadas, o que não refletia as condições reais de um laboratório de controle de qualidade de leite cru. Participaram desse estudo 14 laboratórios europeus que utilizaram as placas Petrifilm e o método convencional preconizado pelo IDF (International Dairy Federation). Os resultados indicaram que a enumeração da flora aeróbia foi 10% inferior à real e que a enumeração de coliformes foi 82% superior à real.

O sistema Petrifilm foi também investigado quanto à sua conveniência para determinação da qualidade microbiológica de carne de caranguejo, que constitui um alimento bastante consumido nos Estados Unidos. Em dois estudos diferentes (Ingham e Moody, 1990, e Ellender e cols., 1993) ficou demonstrado que as placas Petrifilm fornecem resultados similares aos obtidos pela metodologia convencional de plaqueamento, representando uma alternativa econômica e prática para monitoramento

dos pontos críticos de controle no processamento da carne caranguejo.

De acordo com os trabalhos comentados até agora é possível observar que em todos eles as contagens de bactérias aeróbias totais nas placas Petrifilm foram equivalentes às contagens obtidas pelo método convencional, o que também foi observado no presente estudo. No entanto, com relação à contagem de coliformes totais, vários trabalhos reportaram que as contagens nas placas Petrifilm foram inferiores às do plaqueamento convencional (Senyk e cols., 1987; Bailey e Cox, 1987; Restaino e Lyon, 1987; Smith e cols., 1989; Curiale e cols., 1989), principalmente em alimentos com elevada carga microbiana acompanhante. O fato das contagens de coliformes totais em vegetais crus estudados nesse trabalho terem sido inferiores às obtidas no plaqueamento convencional reforçam essa explicação. Contribui ainda para a menor eficiência do sistema Petrifilm em vegetais a injúria provocada pelo ambiente desfavorável à sobrevivência bacteriana nesse tipo de alimento.

Quanto aos resultados relativos a bolores e leveduras, verifica-se que os dados obtidos nesse estudo são concordantes com os obtidos por outros autores. Beuchat e cols., 1990, realizaram um estudo de validação das placas Petrifilm para contagem de bolores e leveduras em laticíneos e alimentos de alta acidez, comparando os resultados com aqueles obtidos pelo método convencional de plaqueamento em agar batata acidificado (em superfície e em profundidade) e em agar padrão para contagem suplementado com cloranfenicol (em superfície e em profundidade). Elevados índices de correlação ($>0,99$) foram obtidos. Leituras obtidas com 5 dias de incubação foram significativamente superiores às obtidas com 3 dias de incubação ($p<0,05$).

Em outro estudo realizado pelos mesmos autores do estudo anterior (Beuchat e cols., 1991), as placas Petrifilm para contagem de bolores e leveduras foram também avaliadas com outros tipos de alimentos: leite em

pó desnatado, produtos cárneos, nozes, massas, batatas desidratadas, condimentos, frutas e outros. Esses autores relataram resultados melhores para o Petrifilm em alguns produtos e piores em outros, quando comparados com aqueles obtidos por plaqueamento em agar batata acidificado e em agar padrão para contagem suplementado com cloranfenicol. Os autores comentaram ainda que partículas sólidas desse alimentos interferem significativamente nas contagens.

Com o surgimento de vários sistemas alternativos para quantificação rápida da carga microbiana em alimentos, houve a necessidade de se fazer um estudo comparativo desses novos sistemas, incluindo as placas Petrifilm. Chain e Fung, 1991, compararam a eficiência dos sistemas Redigel, Petrifilm, Isogrid, plaqueamento em espiral e do sistema convencional de plaqueamento na enumeração de bactérias aeróbias em vários alimentos: peito de frango, carne moída crua, nozes sem casca, leite cru, tomilho e farinha de trigo. Os resultados indicaram que os cinco métodos eram equivalentes, com elevado grau de precisão e concordância. Resultados idênticos foram obtidos por Cormier e cols., 1993, ao trabalharem com produtos marinhos.

Mais recentemente, Wakabayashi e Miyao, 1993, compararam os sistemas Petrifilm, plaqueamento em espiral, Pro.mediaTM e ColilertTM para enumeração de bactérias aeróbias totais e coliformes em vegetais fermentados, verificando coeficientes de correlação bastante elevados entre esses métodos.

As placas Petrifilm para contagem de bactérias totais foram também avaliadas quanto a sua eficiência na determinação da vida útil de leite pasteurizado realizada pela enumeração das bactérias psicrófilas. Bishop e Juan, 1988, verificaram que os resultados obtidos eram os mesmos que os obtidos pelo método de plaqueamento convencional. Posteriormente, Byrne e cols., 1989, verificaram que, utilizando uma etapa preliminar de incubação do leite pasteurizado por 18h a 21°C, seguida

de uma técnica de plaqueamento, era possível fazer uma estimativa da vida útil do leite. Esses autores observaram ainda que as placas Petrifilm para contagem de bactérias totais atendiam perfeitamente as necessidades das usinas de beneficiamento de leite na utilização de um método rápido, barato e de fácil execução nessa determinação.

Byrne e Bishop, 1991, observaram também que as placas Petrifilm para contagem de bactérias totais eram muito convenientes para a enumeração de bactérias termodúricas em leite cru, principalmente espécies de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*, que indicam práticas higiênicas inadequadas e, conseqüentemente, comprometimento da vida útil do leite após a pasteurização.

Com o conhecimento da eficiência de testes de detecção de *E.coli* baseados na atividade beta-glucuronidásica desse microrganismo, as placas Petrifilm para coliformes totais foram adaptadas para contagem de *E.coli* através da incorporação de um indicador de atividade glucuronidásica no meio de cultura desidratado. As placas Petrifilm para contagem de *E.coli* permitem, portanto, enumerar os coliformes e também *E.coli*, cuja colônia é de coloração azul, com bolhas de gás a sua volta. Colônias de coliformes "não *E.coli*" são vermelhas. Em 1990, Matner e cols. realizaram um estudo de avaliação desse novo tipo de placa Petrifilm, trabalhando com queijos, vegetais congelados e carne crua de frango e de peru, fazendo a contagem de coliformes totais em placas Petrifilm e também em placas convencionais de agar violeta bile vermelho fenol. A contagem de *E.coli* foi feita também nas placas Petrifilm e, como método convencional, foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos em caldo lauril sulfato triptose suplementado com MUG. Os resultados mostraram que, nesses produtos, as placas Petrifilm para *E.coli* foram tão boas ou melhores que a técnica dos tubos múltiplos na detecção de *E.coli*. Resultados qualitativos sugeriram que as placas Petrifilm

para *E.coli* podem ser mais sensíveis que a técnica dos tubos múltiplos para detecção de números baixos de *E.coli*. Os resultados relativos à coliformes foram os mesmos nos dois métodos.

Com a crescente importância do coliforme *E.coli* 0157:H7 como agente etiológico de uma grave enterocolite hemorrágica causada pelo consumo de produtos cárneos contaminados, o sistema Petrifilm para enumeração desse patógeno (Kit-HEC) está sendo avaliado quando à sua sensibilidade e conveniência para detecção e enumeração rápida nos alimentos. Tsai e cols., 1994, compararam o sistema Petrifilm Kit-HEC com um sistema ELISA EHEC-TEK™, de Organon Teknika Corp., e verificaram que ambos eram capazes de detectar de 1 até 10 células por g.

As placas Petrifilm podem ter aplicações bastante interessantes. Em 1986, McGoldrick e cols., 1986 relataram resultados referentes ao emprêgo de placas Petrifilm para detecção de contaminação em superfícies em contato com alimentos. Devido às suas características peculiares, as placas Petrifilm para contagem de bactérias totais podem substituir com vantagens as placas RODAC e as zaragatoas utilizadas na amostragem de superfícies. O estudo foi conduzido com utensílios de cozinha (bandejas de aço inoxidável e de fibra de vidro) artificialmente contaminados com *B.subtilis*, *Pseudomonas fragii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, obtendo-se elevados índices de correlação com os métodos convencionais (0,923 para as placas RODAC e 0,968 para as zaragatoas).

Um trabalho curioso foi publicado por Barnard e cols., 1991. Esses autores, preocupados com as condições higiênico-sanitárias precárias em locais de venda de produtos lácteos (sorvetes, "milk-shakes", etc), estudaram a conveniência de um kit Petrifilm (Petrifilm Test Kit-L) para monitoramento em campo da qualidade microbiológica desses produtos. O kit consistia de algumas placas Petrifilm para contagem de bactérias totais, algumas para contagem de coliformes, recipientes

com 9ml de diluente e pipetas descartáveis. As placas podiam ser inoculadas "in loco" e incubadas nos bolsos dos funcionários. Os resultados obtidos dessa forma foram comparados aos obtidos pela forma de plaqueamento convencional e foram considerados bastante satisfatórios.

Em todos os estudos aqui discutidos, incluindo o presente, há concordancia com o fato do sistema Petrifilm não ser um método rápido de obtenção de resultado mas um método rápido de execução. Todavia, os resultados obtidos nas contagens de bactérias totais nos 4 tipos de alimentos analisados no presente estudo, obtidos após 24h e após 48h de incubação, foram analisados estatisticamente com o objetivo de se verificar se as placas Petrifilm não permitiriam também a obtenção mais rápida de resultados, quando comparadas ao método convencional. Os resultados dessa análise, referentes à contagem de bactérias totais, apresentados na tabela 5, mostram que, de fato, as contagens feitas após 48h de incubação são significativamente mais altas que as feitas com 24h de incubação. Portanto, o sistema Petrifilm para bactérias totais não fornece resultados mais rápido que o método convencional de plaqueamento.

Resultados similares foram obtidos na contagem de bolores e leveduras. As contagens feitas com 5 dias de incubação foram significativamente superiores às contagens feitas com 3 dias de incubação (tabela 6).

No que diz respeito aos coliformes totais, verificou-se que, tanto no sistema Petrifilm (tabela 7) quanto no método convencional de plaqueamento (tabela 8), em carnes e derivados e em vegetais crus, as contagens feitas com 24h de incubação foram significativamente menores que as contagens feitas com 48h de incubação. Essa constatação é bastante preocupante, visto que resultados incorretos podem estar sendo obtidos, tanto pelo método oficial de plaqueamento quanto pelo sistema Petrifilm.

O sistema Petrifilm, assim como qualquer método de análise apresenta vantagens e desvantagens. Entre as vantagens, deve-se destacar:

- 1 - o sistema Petrifilm minimiza o trabalho laboratorial;
- 2 - o sistema Petrifilm está pronto para uso a qualquer momento;
- 3 - no sistema Petrifilm as colônias são de fácil contagem devido à melhor visibilidade devido à sua cor;
- 4 - o sistema Petrifilm pode ser utilizado em campo;
- 5 - o sistema Petrifilm não submete as bactérias à choque térmico que acontece no método convencional quando se adiciona o meio de cultura fundido, e, portanto, quente.
- 6 - o sistema Petrifilm tem a aprovação de organismos internacionalmente reconhecidos.
- 7 - as placas Petrifilm utilizadas em análises de alimentos podem ser anexadas aos laudos de resultados como comprovação das contagens obtidas.
- 8 - as placas Petrifilm contendo colonias podem ser congeladas e descongeladas posteriormente para testes adicionais.

Como desvantagens, destaca-se:

- 1 - é necessário inocular as placas com muito cuidado, e não move-las enquanto ocorre a gelificação;
- 2 - o tamanho da amostra a ser inoculada deve ser sempre 1ml, não podendo ser maior pois haverá extravasamento, nem menor pois o meio de cultura desidratado não se hidratará adequadamente;
- 3 - coliformes são de difícil contagem quando a flora acompanhante é muito grande e variada;

Resumo

Esse estudo refere-se à avaliação das placas Petrifilm para contagem de bactérias totais, de coliformes totais e de bolores e leveduras em alimentos de origem animal e vegetal consumidos em São Paulo, SP. Entre os alimentos estavam produtos cárneos crus e processados (24 amostras), leite pasteurizado (11 amostras), queijos (18 amostras) e vegetais crus (10 amostras). Após adequada homogeneização e diluição decimal seriada das amostras, efetuou-se a contagem de bactérias totais, coliformes totais e bolores e leveduras por plaqueamento nas placas Petrifilm, de acordo com instruções do fabricante (3M do Brasil, Ltda.), e nas placas convencionais, de acordo com BAM/AOAC. A análise estatística ($\alpha=0,5\%$) dos dados obtidos indicou que os resultados obtidos pelos dois métodos foram equivalentes, excetuando-se as contagens de coliformes totais em vegetais, que, nas placas Petrifilm foram inferiores às obtidas nas placas convencionais.

Summary

This study was carried out in order to evaluate the Petrifilm system for enumeration of total bacteria, total coliforms and yeasts and molds in food consumed in São Paulo, SP. Food samples included raw and processed meat products (24 samples), pasteurized milk (11 samples), cheese (18 samples) and raw vegetables (10 samples). After proper homogenization and decimal dilution, samples were plated on Petrifilm aerobic count plates, Petrifilm total coliforms plates and Petrifilm yeasts and molds plates, according to 3M Co, Inc., and also plated on conventional plates, according to BAM/AOAC. Statistical

analysis ($\alpha=0.5\%$) of data indicated that results obtained in Petrifilm plates were equivalent to the ones obtained by conventional procedures, except for raw vegetables. In these products, Petrifilm counts were lower than the ones in conventional plating.

Parte III

Avaliação do kit *Salmonella* 1-2 Test para pesquisa de salmonelas móveis em produtos cárneos

Introdução

Os métodos clássicos para pesquisa de *Salmonella* em alimentos envolvem uma sequência de etapas indispensáveis para o sucesso de uma análise. Assim, é necessária uma etapa de pré-enriquecimento (16-24h) para permitir a recuperação e posterior multiplicação das salmonelas injuriadas, uma etapa de enriquecimento seletivo (18-48h) para aumentar a concentração de salmonelas em relação aos demais microrganismos presentes e uma etapa de plaqueamento em meios sólidos seletivos diferenciais (24-48h) para isolamento das salmonelas presentes. São necessários também testes bioquímicos e sorológicos (4-48h) para identificação adequada das colônias obtidas nos meios sólidos. Todas essas etapas significam 5 a 8 dias para que um resultado possa estar disponível (BAM/AOAC, 1992; APHA, 1992; ISO, 1991).

Com o objetivo de acelerar a obtenção de resultados, uma série enorme de novos métodos alternativos para a pesquisa de *Salmonella* em alimentos tem sido descritos, alguns já suficientemente avaliados, outros ainda em fase de avaliação. Esses métodos alternativos foram apresentados na parte I desse trabalho.

Algumas das novas técnicas rápidas exigem equipamentos especiais, muitas vezes sofisticados e caros, o que limita sua utilização em muitos laboratórios. No entanto, algumas técnicas alternativas são menos dispendiosas e, portanto, tem uma possibilidade maior de serem utilizados nos laboratórios que não possam, ou não queiram, dispender muitos recursos. Uma dessas técnicas de custo relativamente baixo é a técnica de imunoimobilização que constitui o princípio de funcionamento do kit *Salmonella* 1-2 Test, produzido e

comercializado por BioControl Systems, Inc., Bothell, WA, Estados Unidos. Até o momento, não há no Brasil representante comercial dessa empresa, devendo os interessados em adquirir o kit contactar diretamente o fabricante nos Estados Unidos (BioControl Systems, Inc., 19805 North Creek Parkway, Bothell, WA 98011, fone 001-206-4872055 e fax 001-206-4871476). Acredita-se oportuno mencionar que o custo de cada kit varia entre 7 e 9 dólares americanos, dependendo da quantidade adquirida.

O kit *Salmonella* 1-2 Test é o único entre os métodos chamados rápidos baseado em imunodifusão. Esse kit é composto por duas câmaras plásticas interligadas, sendo que uma delas (câmara de inoculação) contém meio de enriquecimento seletivo para *Salmonella* e a segunda (câmara de motilidade) agar semi-sólido e anticorpos flagelares anti-*Salmonella*, conforme apresentado na figura 9.

Full-size representation of a 1-2 Test

1-2 Test Diagram

Figura 9. Apresentação esquemática do kit *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., Bothell, WA, EUA)

Quando salmonelas móveis estão presentes na câmara de inoculação, elas migram dessa câmara para a câmara de motilidade através do orifício de interligação. Uma vez na câmara de motilidade, elas se difundem pelo meio semi-sólido até encontrar o antisoro com o qual reagem formando uma banda de precipitação. Salmonelas imóveis não são detectadas nesse teste.

Para a utilização do kit os seguintes passos são necessários:

- 1 - alimentos crus ou altamente contaminados devem ser submetidos à uma etapa de pré-enriquecimento em caldo lactosado a 35°C por 24+/-2h e a um enriquecimento seletivo em caldo tetrationato verde brilhante a 35°C por 24+/-2h. Alimentos com baixa contaminação podem ser submetidos apenas a uma etapa de enriquecimento;
- 2- O kit *Salmonella* 1-2 Test deve estar em temperatura ambiente no momento do uso. O primeiro passo consiste em remover a tampa da câmara de inoculação e adicionar uma gota de solução de iodo-iodeto, recolocando a tampa em seguida (figura 10);

Figura 10. Preparo da câmara de inoculação

3 - Com o kit posicionado com a câmara de inoculação na posição horizontal, remove-se a tampa da câmara de motilidade e, com uma tesoura, corta-se a ponta do "plug" ligado à essa tampa. A operação de remoção da tampa com o "plug" faz com que se forme um buraco na parte superior do agar semi-sólido que deve ser preenchido com uma gota do antisoro que acompanha o kit. Em seguida, a tampa, já sem o "plug", deve ser recolocada (figura 11);

Figuras 11. Preparo da câmara de motilidade

4 - O kit deve ser agora girado de 90º, ou seja, a câmara de inoculação deve ficar na posição vertical. Remove-se a tampa, e com o auxílio de uma pinça, remove-se o "plug" (figura 12).

Figura 12. Remoção do plug de comunicação entre as duas câmaras

5 - Adiciona-se 0,1 ml da amostra em análise, devidamente enriquecida e homogeneizada. Após a recolocação da tampa, o kit está pronto para ser incubado, devendo a incubação ser feita a 35°C por no mínimo 14 h e no máximo 30 h (figura 13).

Figura 13. Adição da amostra em teste

6 - A leitura do kit é feita observando-se a formação de uma imunobanda de precipitação, em forma de U, no alto da câmara de motilidade (figura 14).

Figura 14. Leitura do kit (à esquerda: resultado positivo; à direita: resultado negativo)

Em seguida ao lançamento no mercado dos Estados Unidos, o kit *Salmonella* 1-2 Test foi submetido a um estudo colaborativo para sua validação junto à AOAC, EUA (Flowers e Klatt, 1989). Com esse estudo, em 1989, o método recebeu a aprovação inicial da AOAC (AOAC first action, method 989.13). No momento, aguarda-se a aprovação definitiva do kit (Feldsine, comunicação pessoal).

Em seguida ao estudo colaborativo de Flowers e Klatt, 1989, vários trabalhos foram publicados, relatando resultados referentes à avaliação desse sistema como método de triagem rápida da presença de *Salmonella* em alimentos (D'Aoust e Sewell, 1988; Nath e cols., 1989;

Holbrook e cols., 1989; Oggel e cols., 1990; Humbert e cols., 1990; St.Clair e Klenk, 1990; Bailey e Cox, 1991). Esses trabalhos deixam bastante claro que a eficiência do kit *Salmonella* 1-2 Test é altamente dependente das condições em que se processam o pré-enriquecimento e o enriquecimento seletivo do alimento a ser analisado e de algumas características intrínsecas desse alimento, principalmente a natureza e as dimensões da flora microbiana acompanhante.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de se avaliar esse kit em nosso meio, trabalhando-se com produtos carneos crus de origem suína, comercializados na cidade de Santo André, SP, que, em um estudo bastante recente realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Fuzihara e Franco, 1992) revelaram-se um importante veículo de salmonelas.

Para a avaliação do kit, 100 amostras de carne suína crua e 63 de linguiça de suíno, coletadas em açougues de Santo André, SP, foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* simultaneamente por dois métodos de cultivo convencionais (BAM/AOAC, 1992 e ISO, 1991) e pelo kit *Salmonella* 1-2 Test utilizando os procedimentos de enriquecimento dos alimentos propostos pelo fabricante e também pelo kit *Salmonella* 1-2 Test utilizando um procedimento de enriquecimento modificado.

Material e métodos

Amostras de alimentos: foram analisadas 163 amostras de produtos cárneos de origem suína, sendo 100 de carne suína crua refrigerada (lombo, pernil, etc) e 63 de linguiça de suíno, também refrigerada, de variadas marcas comerciais. As amostras foram adquiridas em 10 açougues selecionados ao acaso na região central da cidade de Santo André, SP. Os produtos foram transportados ao

laboratório em recipientes de isopor com gelo reciclável e analisadas no mesmo dia.

Preparo das amostras para análise: de cada uma das amostras, transferiu-se pequenas porções representativas da amostra para dois sacos plasticos estéreis, até um total de 25g em cada saco. A um dos sacos adicionou-se 225ml de caldo lactosado (Difco) e ao outro 225ml de água peptonada tamponada (Difco). Cada saco foi então introduzido no Stomacher (Seward Medical, Ltd, Londres, Inglaterra) para uma ligeira homogeneização.

Pesquisa de *Salmonella* pelo método BAM/AOAC, 1992 (Mét 1): cada saco plástico contendo amostra e caldo lactosado foi deixado à temperatura ambiente por 1h. O pH do meio foi observado e quando necessário, foi ajustado para 6,8 +/-0,2. Em seguida adicionou-se 2,25ml de Triton X100 agitando-se a mistura manualmente. O saco, convenientemente fechado, foi então incubado a 35°C por 24+/-2h. Decorrido o tempo de incubação, 1ml do caldo lactosado foi transferido para um tubo contendo 10ml de caldo tetrationsato verde brilhante (Difco) que foi incubado a 35°C por 24+/-2h. Em seguida, o caldo tetrationsato foi homogeneizado em um agitador de tubos e semeado, com uma alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo agar seletivo para *Salmonella*.

Pesquisa de *Salmonella* pelo método ISO, 1991 (Met 2): cada saco plástico contendo amostra e água peptonada tamponada foi deixado à temperatura ambiente por 1h e em seguida incubado a 35°C por 24+/-2h. 1ml dessa cultura foi transferido para um tubo contendo 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco), que foi incubado a 41°C por 24+/-2h.

Pesquisa de *Salmonella* pelo método *Salmonella* 1-2 Test, seguindo protocolo do fabricante (Mét. 3): o caldo tetrationsato verde brilhante, incubado a 35°C por 24+/-

2h, utilizado no método convencional seg. BAM/AOAC, 1992, foi empregado para inoculação do kit. 0,1ml desse caldo foram transferidos para a câmara de inoculação do kit preparado para uso conforme as instruções do fabricante, já descritos em Introdução. Após a incubação do kit a 35°C por 24+/-2h, observou-se a presença da imunobanda de precipitação, anotando-se o resultado. Todos os kits, com e sem imunobanda, foram semeados em agar Rambach e agar Hoectoen enteric para isolamento e identificação de *Salmonella*, empregando-se a câmara de inoculação como fonte de inóculo. Colônias suspeitas nas placas foram submetidas aos procedimentos de identificação descritos abaixo.

Pesquisa de *Salmonella* pelo método *Salmonella* 1-2 Test, seguindo protocolo modificado (Mét. 4): o caldo Rappaport-Vassiliadis incubado a 41°C por 24+/-2h, utilizado no método convencional seg.ISO, 1991, foi empregado para a inoculação do kit: 0,1ml desse caldo foram transferidos para a câmara de inoculação, conforme procedimento já descrito anteriormente. Após incubação do kit a 35°C por 24+/-2h, efetuou-se a leitura observando-se a presença de imunobanda de precipitação, semeando-se todos os kits (positivos e negativos) em agar Rambach e agar Hoectoen enteric para isolamento e identificação de *Salmonella*, conforme metodologia descrita abaixo.

Isolamento e identificação de *Salmonella*: Para isolamento de colônias, fez-se a semadura dos caldos de enriquecimento seletivo (caldo tetracionato verde brilhante e caldo Rappaport Vassiliadis) em uma placa contendo agar Rambach (Merck) e em outra contendo agar Hoectoen enteric (Difco). Após a incubação a 35°C por 18-24h, as placas foram examinadas quanto à presença de colônias características de *Salmonella*: agar Rambach - colônias vermelhas, de contorno bem nítido e definido, agar Hoectoen enteric - colônias verde-azuladas ou azuis com ou sem centro negro. Várias colônias suspeitas de

Salmonella foram repicadas para tubos contendo agar tríplice açúcar ferro e tubos contendo agar lisina ferro, ambos incubados a 35°C por 24+/-2h e 48+/-2h. Em agar tríplice açúcar ferro, *Salmonella* produz reação base amarela e ápice vermelho, com ou sem enegrecimento do meio (produção de H₂S). Em agar lisina ferro, *Salmonella* produz reação alcalina na base (roxa) e a maioria produz H₂S. Todas as colônias com essas características foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos adicionais: produção de urease e de indol, reação de VM e de VP, utilização de citrato e motilidade (Ewing, 1986). Colônias identificadas como *Salmonella* pelos testes bioquímicos foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.). Duas cepas de *Salmonella* para cada amostra de alimento positiva para esse microrganismo foram enviadas para a Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz para sorotipagem completa.

As figuras 15 (pag. 93) e 16 (pag. 94) apresentam um esquema dos 4 métodos utilizados para pesquisa de *Salmonella* nas amostras.

Contrôles: periodicamente, culturas de *Salmonella typhimurium* e de *Escherichia coli* eram empregadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Kits não inoculados com microrganismos também eram utilizados como controle negativo.

Figura 15. Representação esquemática dos métodos M-1 e M-3 utilizados na pesquisa de *Salmonella* em produtos cárneos suínos

25g amostra + 225 ml água peptonada tamponada

Figura 16. Representação esquemática dos métodos M-2 e M-4 utilizados na pesquisa de *Salmonella* em produtos cárneos suínos

Resultados

Um sumário dos resultados obtidos na avaliação das quatro metodologias para pesquisa de *Salmonella* nas 163 amostras de produtos cárneos suínos pode ser visto na tabela 9 (pag 96). A tabela 10 (pag. 97) por sua vez, mostra o comportamento de cada amostra positiva para *Salmonella* em função do método analítico adotado e também os sorotipos das salmonelas isoladas.

Tabela 9. Positividade para Salmonella em produtos cárneos suínos, determinada por quatro métodos diferentes.

	número de amostras analizadas	número de amostras positivas				
		total	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
carne suína crua	100	14	5	11	2	6
linguiça de suíno	63	11	3	10	0	1
totais	163	25	8	21	2	7

Método 1: BAM/AOAC, 1992

Método 2 : ISO 1991

Método 3 : Salmonella 1-2 Test, protocolo do fabricante

Método 4: Salmonella 1-2 Test, protocolo modificado

Tabela 10. Comportamento das amostras de produtos cárneos suínos positivas para Salmonella em função do método de detecção

Item	amostra nr.	Método 1	Método 2	Método 3 *	Método 4*	sorotipos isolados
1	22	-	+	-/-	+ / +	S. infantis
2	26	-	+	-/-	-/-	S.infantis
3	29	-	+	?/-	?/-	S.give
4	31	-	+	-/-	-/-	S.havana
5	32	-	+	+ duv/ +	+ duv/ +	S.panama
6	33	+	+	+ claro/ +	+ claro/ +	S.panama
7	40	+	+	-/-	-/-	S.panama
8	43	-	+	-/-	-/-	S.typhimurium
9	49	+	-	+ duv/ +	-/-	S.agona
10	51	+	+	-/-	+ claro/ +	S.infantis e S.agona
11	53	+	-	-/-	-/-	S.infantis
12	55	-	+	-/-	+ claro/ +	S.give
13	56	-	+	-/-	-/-	S.give
14	97	-	+	-/-	+ duv/ +	S.seftenberg
15	111	+	+	-/-	+ duv/ +	S.derby
16	126	-	+	-/-	-/-	S.agona
17	36	-	+	-/-	-/-	S.dublin
18	130	-	+	-/-	-/-	S.agona e S.bredney
19	135	+	+	-/-	-/-	S.agona e S.bredney
20	138	-	+	-/-	-/-	S.agona
21	140	-	+	-/-	-/-	S.arratum
22	141	-	+	-/-	+ duv/ +	S.infantis
23	142	-	+	-/-	+ duv/ +	S.rissen
24	158	-	+	-/-	-/ +	S.l.4,12:-1,7 e S.give
25	159	+	-	-/-	-/-	S.give e S.agona

* = resultados da leitura visual do kit e leitura após plaqueamento do kit

Conforme apresentado na tabela 9, verifica-se que das 163 amostras de produtos cárneos suínos, 25 (15,3%) foram positivas para *Salmonella*. Considerando os dois grupos de alimentos separadamente, 14 (14,0%) entre 100 amostras de carne crua e 11 (17,5%) entre 63 amostras de linguiça de suíno foram positivas para *Salmonella*. Relativamente aos sorotipos detectados nessas amostras, verifica-se que 20% (5 amostras) apresentaram dois sorotipos diferentes na mesma amostra. Quanto aos sorotipos mais frequentemente isolados, houve predominância de *S.agona*, isolada de 7 amostras diferentes. Em seguida vieram os sorotipos *S.give* e *S.infantis*, com 5 isolamentos cada, *S.panama* com 3 isolamentos e *S.bredney*, com 2 isolamentos. Foram ainda isolados os sorotipos *S.typhimurium*, *S.havana*, *S.seftenberg*, *S.derby*, *S.dublin*, *S.anatum*, *S.rissen* e *S.I 4,12:-;1,7* com 1 isolamento cada.

Relativamente à avaliação das metodologias para isolamento de *Salmonella* a superioridade da técnica convencional ISO, 1991, que utiliza pré-enriquecimento em água peptonada tamponada e enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis a 41°C, em relação aos demais métodos, ficou bastante evidente. Das 25 amostras positivas para *Salmonella*, 21 (84%) foram positivas por essa técnica enquanto apenas 8 (32%) foram positivas pela técnica convencional do BAM/AOAC. Esses resultados eram, de certa forma, esperados, uma vez que diversos estudos anteriores já haviam comprovado que o enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis a 41°C é muito mais eficiente que o caldo tetracionato para esse enriquecimento, mesmo quando esse é incubado a 41-43°C. (D'Aoust, 1984; De Smedt e cols., 1986; Vassiliadis, 1983).

Quanto ao kit *Salmonella* 1-2 Test, os resultados indicaram que não houve um comportamento satisfatório. Seguindo à risca as instruções do fabricante, apenas 2 (8%) das 25 amostras positivas para *Salmonella* deram resultado positivo nesse teste. Quando o protocolo do

fabricante, relativo às etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra foi substituído por aquele utilizado na metodologia ISO, 1991, a eficiência do kit foi muito melhor: 7 (28%) das amostras foram positivas. Ainda assim, a eficiência do kit continuou sendo menor que a do método clássico (tabela 9).

Conforme apresentado na tabela 10, verifica-se ainda que, das 2 amostras positivas pelo kit *Salmonella* 1-2 Test utilizado conforme instruções do fabricante, em apenas 1 a leitura do kit não deixou dúvidas quanto à positividade do resultado. Na outra amostra, a imunobanda não era nítida, com um aspecto difuso, lembrando uma nuvem. A positividade dessa amostra só foi evidenciada após o plaqueamento do kit nos meios para isolamento de colônias. Por outro lado, entre as 7 amostras positivas quando o protocolo modificado foi empregado, em 4 os resultados do kit foram claríssimos, com imunobandas nítidas e com a morfologia esperada (em forma de U). Em outras 6 amostras, as imunobandas formadas eram de difícil interpretação. Entre essas, 3 resultados possivelmente positivos foram confirmados como positivos e 3 resultados nessa situação revelaram-se negativos. Ocorreu ainda uma amostra (no 58), que não apresentou nenhuma banda de precipitação mas, que após o plaqueamento revelou-se positiva para *Salmonella*. Curiosamente, justamente nessa amostra salmonelas de dois sorotipos diferentes estavam presentes (*S.give* e *S.I* 4,12:-;1,7).

Analisando com cuidado os resultados apresentados na tabela 10, é possível verificar que houve uma combinação bastante variada de resultados:

- apenas uma amostra (nº 33) entre 25 positivas para *Salmonella* foi positiva pelos 4 métodos simultaneamente;
- uma amostra (nº 51) foi positiva por 3 dos 4 métodos utilizados. O método que não deu resultado positivo para essa amostra foi justamente o kit *Salmonella* 1-2 Test empregado conforme recomenda o fabricante;

- três amostras (n^{os} 40, 111 e 135) foram positivas apenas nos métodos convencionais de plaqueamento, ou seja, para essas três amostras o kit *Salmonella* 1-2 Test não funcionou, independentemente do protocolo de enriquecimento adotado (resultados considerados falso-negativos);
- quatro amostras (n^{os} 22, 55, 97 e 158) só foram positivas para *Salmonella* quando a metodologia convencional ISO, 1991, foi empregada. Essas amostras foram negativas quando o método BAM/AOAC foi utilizado para pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo.
- em cinco amostras (n^{os} 40, 51, 53, 111 e 135) o caldo tetracionato utilizado para enriquecimento seletivo revelou a presença de *Salmonella* que não foi detectada no kit semeado com esse mesmo caldo. O mesmo aconteceu com o caldo Rappaport-Vassiliadis em 15 amostras (n^{os} 26, 29, 31, 40, 43, 56, 111, 126, 36, 130, 135, 138, 140, 141 e 142). Todos esses resultados foram considerados falso-negativos.
- em uma amostra (n^o 32) o kit *Salmonella* 1-2 Test inoculado com o caldo Rappaport-Vassiliadis deu resultado positivo mas esse caldo foi negativo para *Salmonella* quando plaqueado (resultado considerado falso-positivo).

Discussão

Lógo após o seu lançamento, o kit *Salmonella* 1-2 Test foi submetido a um estudo colaborativo para sua validação junto à AOAC. Esse estudo, coordenado por Flowers e Klatt, 1989, foi realizado por 23 laboratórios americanos, que trabalharam simultaneamente com 6 produtos alimentícios diferentes: pimenta do reino moída, farinha de soja, ovo desidratado, leite, chocolate, leite em pó desnatado e carne crua de peru. Amostras idênticas, inoculadas e não inoculadas com *Salmonella*, foram distribuídas aos laboratórios participantes, que foram analisadas através do método convencional BAM/AOAC e

através do kit simultaneamente. Foi observado 96,1% de concordância entre os dois métodos. Os autores reportaram ainda 3,6% de resultados falso-negativos pelo kit *Salmonella* 1-2 Test e 1,7% pelo método convencional BAM/AOAC. Foi com esse estudo que o método da imunodifusão para triagem de salmonelas móveis em alimentos recebeu a aprovação da AOAC (AOAC first action, method 989.13).

Quase simultaneamente ao estudo colaborativo de Flowers e Klatt, 1989, o kit *Salmonella* 1-2 Test foi avaliado no Canadá por D'Aoust e Sewell, 1989, com 186 produtos alimentícios de alta e de baixa umidade, analisados também pelos métodos convencionais. Dos alimentos estudados, 46 (42,7%) foram positivos para *Salmonella*, considerando todos os métodos adotados combinados. O método de plaqueamento convencional identificou 93,5% das amostras positivas enquanto o kit *Salmonella* 1-2 Test detectou apenas 43,5% e 54,3%, após 8h e 24h de incubação, respectivamente. Os autores atribuíram a baixa eficiência do novo método à baixa seletividade do caldo de enriquecimento e à incapacidade do teste de detectar salmonelas na presença de elevada carga de flora acompanhante.

Logo em seguida, em 1989, Nath e cols., no Canadá, publicaram um trabalho relatando também diferenças significativas na positividade para *Salmonella* em 196 amostras de alimentos diversos quando o kit *Salmonella* 1-2 Test foi utilizado. Quando comparado com o método oficial canadense, o método da imunodifusão detectou apenas 26 amostras positivas de um total de 36 amostras positivas para *Salmonella*. No entanto, quando os autores introduziram uma modificação no protocolo de enriquecimento recomendado pelo fabricante (caldo nutriente, a 35°C por 18-24h) incluindo uma etapa adicional de enriquecimento seletivo em caldo tetracionato verde brilhante, feito a 43°C por 18-24h, os resultados de positividade para *Salmonella* foram mais altos e foram idênticos nos dois métodos.

Resultados similares foram publicados na França por Humbert e cols., 1990, que também verificaram sensível melhora na positividade para *Salmonella* em derivados de carne de aves quando eram empregadas duas etapas de enriquecimento ao invés de uma só. Segundo esses pesquisadores, na primeira situação a sensibilidade do kit foi 30% e a especificidade 91%. Adotando as duas etapas de enriquecimento, a sensibilidade aumentou para 93% e a especificidade para 100%.

Baseados nesses estudos, os fabricantes do kit *Salmonella* 1-2 Test modificaram o protocolo de sua utilização, oficializando o emprêgo de duas etapas de enriquecimento ao invés de uma só. De acordo com o novo protocolo, alimentos crus ou altamente contaminados devem ser submetidos a um pré-enriquecimento em caldo lactosado a 35°C por 24+/-2h e a um enriquecimento seletivo em caldo tetrationato verde brilhante a 35°C por 24+/-2h, devendo ser esse caldo utilizado para a inoculação do kit. Essa alteração no protocolo de uso teve que ser submetida a novo estudo colaborativo para aprovação da AOAC, o que aconteceu em 1992 (Feng, 1992). Nesse estudo verificou-se que os resultados obtidos com o método original, com o método modificado e com o método convencional foram equivalentes, o que significa que o novo método atende aos requisitos para receber a aprovação final AOAC (final action), que deve acontecer em futuro bem próximo (Feldsine, comunicação pessoal).

O estudo realizado em 1990 por Oggel e cols., no Canadá, apresentou resultados que estão no momento causando uma nova modificação no protocolo de uso do kit *Salmonella* 1-2 Test (D'Aoust, comunicação pessoal). No estudo mencionado, o kit foi utilizado removendo-se o meio de cultura original da câmara de inoculação e substituindo-o pelo caldo utilizado no enriquecimento seletivo das amostras em teste. Os autores trabalharam com 283 produtos alimentícios diferentes, que foram submetidos à pré-enriquecimento em caldo nutriente a 35°C por 18-24h no caso de ovos e derivados e em água

peptonada tamponada no caso dos demais alimentos. Esses caldos de pré-enriquecimento foram transferidos para caldo tetrationato verde brilhante, com incubação a 43°C por 7h apenas. 1,5ml desse último caldo foram então utilizados para inoculação do kit *Salmonella* 1-2 Test, com incubação a 35°C por 15-17h. Essa modificação na metodologia melhorou bastante o nível de concordância dos resultados de positividade para *Salmonella* com aqueles obtidos pelo método oficial canadense. 73 (25,8%) amostras foram positivas pelo método oficial e 70 (24,7%) foram positivas pelo kit *Salmonella* 1-2 Test. Além disso, houve diminuição de um dia no tempo necessário para obtenção de resultados, que, em função das modificações introduzidas, diminuiu de 72h para 48h.

Os resultados obtidos por Oggel e cols., 1990, aliados à vários estudos laboratoriais de avaliação do método modificado, fizeram com que o governo canadense adotasse o kit *Salmonella* 1-2 Test como método oficial para triagem rápida de *Salmonella* em alimentos (Warburton D. e Oggel J., Health Protection Branch, Canada, method MFLP-70).

Estudos comparativos do kit *Salmonella* 1-2 Test tradicional com os métodos convencionais já mencionados, bem como as constantes modificações no protocolo de utilização do kit, deixam claro que essa técnica tem limitações. Apesar da grande vantagem de se obter resultados em menos tempo, o que é muito conveniente quando se necessita de um método de triagem rápida, a eficiência desse kit não tem sido tão boa quanto a dos métodos convencionais de plaqueamento. Os resultados obtidos nesse estudo contribuem para reforçar os resultados já reportados pelos autores mencionados.

Na avaliação de um novo método, é sempre importante considerar que nenhum método correlaciona com outro em mais de 95%. Índices de correlação dessa ordem (0,95), ou superiores, são raramente obtidos, e quando o são, indicam resultados excelentes (Fung, comunicação pessoal). Quando comparado a outros métodos considerados

"rápidos", nos quais a diminuição da especificidade do método é contrabalançada pela rapidez na obtenção de resultados, o kit *Salmonella* 1-2 Test parece ser um dos melhores. St.Clair e Klenk, 1990, publicaram resultados referentes ao comportamento de 3 métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* em alimentos: o kit Gene-Trak *Salmonella*, baseado em técnicas de hibridização de DNA, o kit *Salmonella*-TEK, baseado em técnicas imunoenzimáticas e o kit *Salmonella* 1-2 Test, além do método convencional de plaqueamento. Esses autores trabalharam com 250 amostras de alimentos variados e verificaram que o kit *Salmonella* 1-2 Test detectou *Salmonella* em 97,7% das amostras contaminadas, o kit *Salmonella*-TEK em 91,6% e o kit gene-Trak em 90,8% das amostras positivas para *Salmonella*. O método convencional havia detectado *Salmonella* em 91,6% das amostras positivas.

Bailey e cols., em 1992, desenvolveram um estudo similar em carcaças de frango, comparando os mesmos três kits do estudo anterior. Seus resultados indicaram 66%, 71% e 76% de positividade para *Salmonella* usando o kit *Salmonella* 1-2 Test, o kit Gene-Trak *Salmonella* e o kit *Salmonella*-TEK, respectivamente. Os kits 1-2 Test e Gene-Trak apresentaram os índices mais baixos de resultados falso-positivos, enquanto o kit 1-2 Test apresentou o maior índice de resultados falso-negativos.

Os resultados obtidos no presente estudo concordam com grande parte dos resultados obtidos pelos autores mencionados anteriormente. A positividade para *Salmonella* detectada pelo kit *Salmonella* 1-2 Test foi significativamente inferior àquela observada pelos métodos convencionais. Quando o protocolo de uso foi seguido à risca, somente duas amostras entre 25 positivas foram positivas pelo kit e, entre essas duas apenas uma deu resultado positivo por exame visual da presença de imunobanda de precipitação. A segunda amostra só se revelou positiva após o plaqueamento do caldo do kit.

A modificação das condições de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo das amostras permitiu a detecção

de 7 amostras positivas entre as 25 de fato positivas. Essa melhora de resultados ainda foi considerada insuficiente para que o kit fosse considerado satisfatório para o fim a que se destina.

A possibilidade dos kits empregados nesse estudo terem perdido parte de sua eficiência devido à problemas no transporte do local de produção até o local de utilização e provável armazenamento inadequado dos kits na alfândega foi considerada. Embora, no momento de sua utilização, os kits estivessem dentro de seu prazo de validade, em alguns foi observada ligeira desidratação do meio, que pode ter prejudicado a motilidade das salmonelas e pode ser uma indicação de condições inadequadas de armazenamento. Além de prejudicar os meios contidos nos kits, o transporte e armazenamento incorretos podem ter afetado a reatividade de antisoro, que é o reagente-chave do kit. Embora cepas controle positivas e negativas tenham sido testadas constantemente, é possível que a sensibilidade do antisoro tenha sido insuficiente para detectar *Salmonella* na presença de variada flora acompanhante.

A possibilidade, bastante remota, das salmonelas isoladas serem desprovidas de flagelos foi também considerada. No entanto, os resultados da sorotipagem das salmonelas isoladas fizeram com que essa possibilidade fosse descartada pois todas as salmonelas, sem exceção, eram móveis. Foi considerada ainda a possibilidade, também bastante remota, do antisoro que acompanha o kit ter sido incapaz de reconhecer os antígenos flagelares das cepas de *Salmonella* isoladas de carne suína. No entanto, para a verificação dessa hipótese seria necessário obter um lote de antisoro e checar sua reatividade com as salmonelas isoladas.

De qualquer forma, o presente estudo necessita de estudos complementares, ampliando-o para outros tipos de alimentos e outras condições de utilização do kit. Dessa maneira será possível verificar se a pouca eficiência do kit *Salmonella* 1-2 Test observada até o momento é uma

característica intrínseca ou é consequência de possíveis problemas no transporte e no armazenamento dos kits enviados ao Brasil.

Resumo

Esse estudo refere-se à avaliação do kit *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., WA, EUA) para pesquisa de salmonelas móveis em produtos cárneos suínos. Para a avaliação do kit, 100 amostras de carne suína crua e 63 de linguiça de suíno, coletadas em açougues de Santo André, SP, foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* simultaneamente por dois métodos de cultivo convencionais (BAM/AOAC, 1992 e ISO, 1991) e pelo kit *Salmonella* 1-2 Test utilizando o protocolo de enriquecimento proposto pelo fabricante e também utilizando um protocolo de enriquecimento modificado. Os resultados indicaram que das 25 amostras positivas para *Salmonella*, apenas 2 foram positivas utilizando o kit conforme protocolo do fabricante. Utilizando-se o protocolo modificado, 7 amostras foram positivas. As metodologias convencionais BAM/AOAC, 1992, e ISO, 1991 detectaram 8 e 21 amostras positivas para *Salmonella*, respectivamente. Somente uma das amostras positivas para *Salmonella* foi positiva pelos quatro métodos empregados. A baixa eficiência do kit *Salmonella* 1-2 Test, que está em desacordo com os resultados reportados pela maioria dos trabalhos publicados a esse respeito, foi associada à perda da atividade do antisoro que compõe o kit durante transporte e armazenamento antes do uso.

Summary

This study reports results concerning the evaluation of the kit *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., WA, USA) for rapid detection of motile *Salmonella* in raw pork products. 100 raw pork meat and 63 raw pork

sausages, purchased in Santo Andre, SP., were submitted to detection of *Salmonella* using the conventional procedures proposed by BAM/AOAC, 1992, and by ISO, 1991, and using the *Salmonella* 1-2 Test kit, following the sample enrichment protocol recommended by the producer and a modified enrichment protocol. Results indicated that, among 25 samples positive for *Salmonella*, only 2 were positive when the producer's protocol was followed. When the modified enrichment protocol was used, the number of *Salmonella* positive samples increased to 7. Using conventional procedures, 8 samples were positive by BAM/AOAC, 1992 method, and 21 by ISO, 1991 method. Only one *Salmonella* positive sample was positive by the four methods simultaneously. The low efficiency of *Salmonella* 1-2 Test kit was probably due to loss of activity of antiserum during transport and storage of kits before use.

Referências bibliográficas*

- ABGRALL, B., BOURGEOIS, C.M. Denombrement de la flore totale de produits alimentaires par la technique DEFT. Sci. Alim., Paris, v.9, p.713-724, 1989.
- ABGRALL, B.; CLERET, J.J. Evaluation of PetrifilmTM SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. J. Food Prot., Ames, v.53, n.3, p.213-216, 1990.
- ALVAREZ, R.J. Use of fluorogenic assays for the enumeration of *Escherichia coli* from selected seafoods. J.Food Sci., Chicago, v.49, n.4, p.1186-1187,1232, 1984.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. eds. 3ed. Washington, 1992a. 1219p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Marshall, R.T. ed. 16ed. Washington, 1992b. 450p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D. eds. 18ed. Washington, 1992c. 1100p.
- ANDREWS, W.H. Manual of food quality control. 4.Rev.1. Microbiological Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1992. 338p.
- ANDREWS, W.H., WILSON, C.R.; POELMA, P.L. glucuronidase assay in a rapid MPN determination for recovery of *Escherichia coli* from selected foods. J.Assoc.Off.Anal. Chem., Arlington, v.70, n.1, p.31-34, 1987.
- ARNOTT, M.L.; GUTTERIDGE, C.S.; PUGH, S.J.; GRIFFITHS, J.S. Detection of *Salmonella* in confectionery products by conductance. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.64, n.8, p.409-420, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC) Official methods of analysis. 15.ed., Arlington, 1990. vs.1 e 2.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstract Service Source Index (CASSI) 1990.

- BACK, J.P.; KROLL, R.G. The differential fluorescence of bacteria stained with acridine orange and the effects of heat. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.71, n.1, p.51-58, 1991.
- BAILEY, J.S., COX, N.A. E BLANKENSHIP, L.C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hibridization, antibody immobilization and conventional methods for recovery of naturally occurring *Salmonellae* from processed broiler carasses. J. Food Prot., Ames, v.54, n.5, p.354-356, 1991.
- BAILEY, J.S., COX, N.A. Evaluation of the Petrifilm SM and VRB dry media culture plates for determining microbial quality of poultry. J. Food Prot., Ames, v.50, n.8, p.643-644, 1987.
- BAILEY, J.S., COX, N.A.; BLAKENSHIP, L.C. A comparison of an enzyme imunneassay, DNA hybridization, antibody imubilization and conventional methods for the recovery of naturally occurring *Salmonellae* from processed broiler carcasses. J. Food Prot., Ames, v.54, n.2, p. 291-294, 1991.
- BAKER, J.M.; GRIFFITHS, M.W., COLLIN-THOMPSON, D.L. Bacterial bioluminescence applications in food microbiology. J. Food Prot., Ames, v.55, n.1, p.62-65, 1992.
- BALEBONA, M.C.; MORINIGO, M.A.; CORNAX, R.; BORREGO, J.J.; TORDEGROSSA, V.M.; GAUTHIER, M.J. Modified most probable number technic for the specific determination of *Escherichia coli* from environmental samples using a fluorogenic method. J.Microbiol.Methods, Amsterdam, v.12, p.235-245, 1990.
- BARNARD, S.E., SMELTZ, R.A., ANTHONY, B.A., FULL, N.A. Comparison of Petrifilm™ Test Kit-L and standard cultural methods for determining general sanitation condition of fast food freezers by sampling milk shakes. Dairy Food Environ. Sanit., Ames, v.11, n.3, p.138-139, 1991.
- BAUTISTA, D.A.; MCINTYRE, L.; LALEYE, L.; GRIFFITHS, M.W. The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. J. Rapid Methods Automation Microbiol., Trumbull, v.1, n.3, p.179-193, 1992.
- BETTS, R.P., FERR, L., BANKS, P., STRINGER, M.F. The detection of irradiated foods using DEFT. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.64, p.329-335, 1988.

- BEUCHAT, L., NAIL, B.V., BRACKETT, R.E., FOX, T.L. Comparison of the PetrifilmTM Yeast and Mold culture film method to conventional methods for enumerating yeast and molds in foods. J. Food Prot., Ames, v.54, n.6, p.4430-447, 1991.
- BEUCHAT, L., NAIL, B.V., BRACKETT, R.E., FOX, T.L. Evaluation of a culture film (PetrifilmTM YM) method for enumerating yeasts and molds in selected dairy and high-acid foods. J. Food Prot., Ames, v.53, n.10, p.864,869-874, 1990.
- BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E. Detection of *Listeria* spp. with a monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Food Microbiol., London, v.6, p.171- , 1989.
- BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.12, p.363-374, 1990.
- BISHOP, J.R.; JUAN, J. Improved methods for quality assessment of raw milk. J. Food Prot., Ames, v.52, n.12, p.955-957, 1988.
- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Estimation of potential shelf-life to cottage cheese utilizing bacterial numbers and metabolites. J. Food Prot., Ames, v.48, n.8, p.663-667, 1985.
- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H.; FIRSTENBERG-EDEN, R. A rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. J. Food Prot., Ames, v.47, n.4, p.471-475, 1984
- BLACKBURN, C.W.; CURTIS, L.M.; HUMPHESON, L.; PETITT, S.B. Evaluation of the VITEK Immunodiagnostic Assay System (VIDAS) for the detection of *Salmonella* in foods. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.19, n.1, p.32-36, 1994.
- BOLLIGER, S.; CASELLA, M.; TEUBER, M. Comparative impedance evaluation of the microbial load of different foodstuffs. Lebens. Wiss. u. Technol., Berlin, v.27, n.2, p.177-184, 1994.
- BONVEHI, J.S.; JORDA, R.E. The microbiological quality of honey as determined by aerobic colony counts. J. Food Prot., Ames, v.56, n.4, p.336-337, 1993.
- BRANCHER, I. Avaliação da técnica de membrana filtrante para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em leite e derivados. São Paulo, 1992. 88p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- BRENNER, K.P.; RANKIN, C.C.; ROYBAL, Y.R.; STELMA, G.N.;

- SCARPINO, P.V.; DUFOUR, A.P. New medium for the simultaneous detection of coliforms and *Escherichia coli* in water. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.59, n.11, p.3534-3544, 1993.
- BUSTA, F.F., SPECK, M.L. Enumeration of *Bacillus stearothermophilus* by use of membrane filter techniques to eliminate inhibitors present in milk. Appl. Microbiol., Washington, v.13, n.6, p.1043-1044, 1965.
- BYRNE JR., R.D., BISHOP, J.R. Evaluation of a dry medium culture plate (3M Petrifilm AC) laboratory pasteurized counts. J. Food Prot., Ames, v.54, n.4, p.308-309, 1991.
- BYRNE JR., R.D., BISHOP, J.R., BOLING, J.W. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. J. Food Prot., Ames, v.52, n.11, p.805-807, 1989.
- CANCRO, M.P.; KIENKER, L.J. Basic immunology; an introduction for the development of research tools derived from the immune system. In; MONTVILLE, T.J. Food microbiology: new and emerging technologies. Boca Raton, CRC Press Inc., 1987, v.II. p.61-80.
- CANDLISH, A.A.G. Immunological methods in food microbiology. Food Microbiol., London, v.8, n.1, p.1-14, 1991.
- CANO, R.J.; TORRES, M.J.; KLEM, R.E.; PALOMARES, J.C.; CASADESUS, J. Detection of *Salmonellae* by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.72, p.124-127, 1992.
- CHAIN, V.S., FUNG, D.Y.C. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid, and Aerobic Plate Count for determining the numbers of aerobic bacteria in selected foods. J. Food Prot., Ames, v.54, n.3, p.208-211, 1991.
- CHAN, S.W.; WILSON, S.G.; GARCIA, M.V.; WHIPPY, K., OTTOVIANI, M.; WHILBY, A.; SHAH, A.; JOHNSON, M.A.; MOZOLA, M.A.; HALBERT, D.N. Comparative study of colorimetric DNA hybridization method and conventional culture procedures for detection of *Salmonellae* in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, v.73, n.5, p.419-430, 1990.
- CHEN, H.; DING, H.; CHANG, T. Impedance based method for the rapid enumeration of total bacterial load of pork hamburger and its raw materials. J. Chin. Agr. Chem. Soc., Pequin, v.31, n.3, p.351-356, 1993.

- COPIN, M.P.; BOURGEOIS, C.M. Application de la technique DEFT à la detection a posteriori d'un traitement ionisant sur les produits de volaille. Sci. Alim., Paris, v.12, p.533-542, 1992.
- COPIN, M.P.; JEHANNO, D.; BOURGEOIS, C.M. Detection of food irradiated deep frozen food stuffs by comparison of DEFT and APC counts. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.75, n.4, p. 254-258, 1993.
- CORMIER, A., CHIASSE, S., LEGER, A. Comparison of maceration and enumeration procedures for aerobic count in selected seafoods by standard method, PetrifilmTM, RedigelTM and Isogrid. J. Food Prot., Ames, v.56, n.3, p.249-251, 1993.
- COUSINS, D.L.; MARLATT, F. An evaluation of a conductance method for the enumeration of Enterobacteriaceae in milk. J. Food Prot., Ames, v.53, n.7, p.568-570, 1990.
- CUDJOE, K.S.; THORSEN, L.I.; SORENSEN, T.; RESELAND, J.; OLSVIK, O.; GRANUM, P. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in fecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS-ELISA). Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.12, n.6, p.313-322, 1991.
- CURIALE, M.S., FAHEY, P., FOX, T.L., McALLISTER, J.S. Dry rehydratable films for enumeration of coliforms and aerobic bacteria in dairy products: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.72, n.2., p.312-318, 1989.
- CURIALE, M.S., SONS, T., McALLISTER, J.S., HASLEY, B., FOX, T.L. Dry rehydratable film for enumeration of total aerobic bacteria in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.73, n.2, p.242-248, 1990.
- CURIALE, M.S., SONS, T., McIVER, D., McALLISTER, J.S., HASLEY, B., ROBLEE, D., FOX, T.L. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.74, n.4., p.635-648, 1991.
- CURIALE, M.S.; KLATT, M.J.; MOZOLA, M.A. Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization assay for rapid screening of *Salmonella* in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, v.73, n.3, p.248-256, 1990a.
- CURIALE, M.S.; KLATT, M.J.; ROBINSON, B.J.; BECK, L.T. Comparison of monoclonal enzyme immunoassay screening method for detection of *Salmonella* in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, v.73, n.1, p.43-50, 1990a.

- CURIALE, M.S.; KLATT, M.J.; ROBINSON, B.J.; BECK, L.T. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening method for detection of *Salmonella* in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, v.73, n.1, p.43-52, 1990b.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonella* detection in foods: present status and research needs for the future. J. Food Prot., Ames, v.47, n.1, p.78-81, 1982.
- D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.M. Reliability of the immunodiffusion 1-2 TestTM System for the detection of *Salmonella* in foods. J. Food Prot., Ames, v.51, n.11, p.853-856, 1988.
- DAVIES, C.M. A comparison of fluorochromes for direct viable counts by image analysis. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.13, n.1, p.58-61, 1991.
- De PAOLA, A.; HOPKINS, L.H.; MCPHEARSON, R.M. Evaluation of four methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environm. Microbiol., Washington, v.54, n., p.617-618, 1988.
- Di FALCO, G.; GIACCONE, V.; AMERIO, G.P.; PARISI, E. A modified impedance method to detect *Salmonella* spp. in fresh meat. Food Microbiol., London, v.10, n.5, p.421-427, 1993.
- DIEBEL, K.E.; BANWART, G.J. Comparison of the Stomacher with other systems for breaking clumps and chains in the enumeration of bacteria. J. Food Prot., Ames, v.45, n.10, p.898-902, 1982.
- DONAGHY, J.A.; MADDEN, R.H. Impedance detection of *Salmonella* in processed animal protein and meat. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.16, p.265-269, 1992.
- DONNAGHY, J.A.; MADDEN, R.H. Detection of *Salmonella* in animal protein by Rappaport-Vassiliadis broth using indirect impedimetry. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.17, n.3, p.281-288, 1993.
- ECKNER, K.; DUSTMAN, W.A.; CURIALE, M.S.; FLOWERS, R.S. Elevated temperature, colorimetric, monoclonal, enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of *Salmonella* in foods: collaborative study. J. AOAC Intern., Arlington, v.77, n.2, p.374-394, 1994.
- ELLENDER, R.D.; SHARP, S.L.; COMAR, P.G.; TETTLETON, R.P. Rapid methods to evaluate the bacteriological quality of frozen crabmeat. J. Food Prot., Ames, v.56, n.6, p.545-547, 1993.
- EMSWILER, B.S.; PIERSON, C.J.; KOTULA, A.W. Stomaching vs. blending. Food Technol., Chicago, v.31, n.10, p.40-42, 1977.

- EMSWILER-ROSE, B.; BENNETT, B.; OKREND, A. Comparison of cultural methods and the DNA hybridization test for detection of *Salmonella* in ground beef. J. Food. Sci., Chicago, v.52, p.1726-1735, 1987.
- ENTIS, P. Membrane filtration systems. In: PIERSON, M.D.; STERN, N.J. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology. Marcel Dekker, New York, 1986. p.91-106.
- ENTIS, P. Enumeration of coliforms in nonfat dry milk and canned mustard by hydrophobic grid membrane filter method: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.66, p. 897-904, 1983.
- ENTIS, P. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods by hydrophobic grid membrane filters: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.67, p.812-823, 1984
- ENTIS, P. Hydrophobic grid membrane filter MUG method for total coliform and *Escherichia coli* enumerations in foods - collaborative study. J. Assoc. Anal. Chem., Arlington, v.73, p.936-950, 1989.
- ENTIS, P. Improved hydrophobic grid membrane filter method, using EF-18 agar for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Anal. Chem., Arlington, v.73, p.734-742, 1990.
- ENTIS, P. Membrane filtration systems. In: PIERSON, M.D., STERN, N.J. eds. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology. New York, Marcel Dekker, 1986. p.91-106.
- ENTIS, P.; BOLESZCZUK, P. Direct enumeration of coliforms and *Escherichia coli* by hydrophobic grid membrane filter in 24 hours using MUG. J. Food Prot., Ames, v.53, p.948-952, 1990.
- EWING, W.H. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4a. ed. Elsevier Science Publishing Co, Inc., New York, 1986. 536p.
- FACH, P.; HAUSER, D.; GUILLOU, J.P.; POPOFF, M.R. Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.75, n.3, p.234-239, 1993.
- FELDSINE, P.T.; FALBO-NELSON, M.T.; HUSTEAD, D.L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: collaborative study. J. AOAC Intern., Arlington, v.75, n.6, p.1032-1044, 1992.

- FELDSINE, P.T.; FALBO-NELSON, M.T.; HUSTEAD, D.L. ColiCompleteTM substrate supporting disc method for confirmed detection of total coliforms and *Escherichia coli* in all foods: comparative study. J. AOAC Intern., Arlington, v.77, n.1, p.58-63, 1994.
- FENG, P. Commercial assay system for detecting foodborne *Salmonella*: a review. J. Food Prot., Ames, v.55, n.11, p.927-934, 1992.
- FENG, P. C. Rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. J. Food Drug Anal., Washington, v.1, n.2, p.229-232, 1993.
- FENG, P.C.S.; HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.43, n.6, p.1320-1329, 1982.
- FIFIELD, C.W.; HOFF, J.E.; PROCTOR, B.E. The Millipore filter for enumerating coliform organisms in milk. J.Dairy Sci., Champaign, v.40, p.588-589, 1957.
- FITTER, S.; HEUZENROEDER, M.; THOMAS, C.J. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.73, n.1, p.53-59, 1992.
- FITTS, R. Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. Food Technol., Chicago, v.39, n.3, p.39-40, 1985.
- FITTS, R.; DIAMOND, M.; HAMILTON, C.; NERI, M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* in foods. Appl. Environm. Microbiol., Washington, v.46, n.11, p.1146-1151, 1983.
- FLOWERS, R.S. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. Food Technol., Chicago, v.39, p.103-108, 1985.
- FLOWERS, R.S. E KLATT, M.J. Immunodiffusion screening method for detection of motile *Salmonella* in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.72, n.2, p.303-311, 1989.
- FLOWERS, R.S.; KLATT, M.J.; MOZOLA, M.A.; CURIALE, M.S.; GABIS, D.A.; SILLIKER, J.H. Microbiological methods. DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* in foods; collaborative study. J. Assn. Off. Anal. Chem., Arlington, v.70, p.521-527, 1987b.

- FLOWERS, R.S.; MOZOLA, M.A.; CURIALE, M.S.; GABIS, D.A.; SILLIKER, J.H. Comparative study of a hybridization method and the conventional cultural procedure for detection of *Salmonella* in foods. J. Food Sci., Chicago, v.51, p.781-785, 1987a.
- GANNON, V.P.; KING, R.K.; KIM, J.Y.; THOMAS, E.J. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.58, n.12, p.30809-3815, 1992.
- GIBSON, D.M.; COOMBS, P.; PIMBLEY, D.W. Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods. J. AOAC Int., Arlington, v.75, n.2, p.293-302, 1992.
- GINN, R.E., PACKARD, V.S., FOX, T.L. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.69, n.3, p.527-531, 1986.
- GINN, R.E., PACKARD, V.S., FOX, T.L. Evaluation of the 3M dry culture plate (PetrifilmTM SM) method for determining numbers of bacteria in raw milk. J. Food Prot., Ames, v.47, n.10, p.753-755, 1984.
- GOULARTE, L. Avaliação do método fluorogênico para enumeração de *Escherichia coli* em leite e derivados. São Paulo, 1992. 66p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- GRAUMLICH, T.R. Estimation of bacterial populations in orange juices by bioluminescence. J. Food Sci., Chicago, v.50, p.116-117, 1985.
- GRIFFITHS, M.W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. J. Dairy Sci., Champaign, v.76, n.12, p.3118-3125, 1993.
- GUTHERTZ, L.S.; OKOLUK, R.L. Comparison of miniaturized multitest system with conventional methodology for identification of Enterobacteriaceae from foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.35, n.1, p.109-112, 1978.
- HANCOCK, I.; BOINTON, B.M.; MCATHEY, P. Rapid detection of *Listeria* species by selective impedimetric assay. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.16, p.311-314, 1993.
- HARRIS, L.; HUMBER, J. Automicrobic System for biochemical identification of *Listeria* species isolated from foods; collaborative study. J. AOAC Intern., Arlington, v.76, n.4, p.822-835, 1993.

- HILL, W.E. Detection of bacteria in foods using DNA hibridization. In: TENOVER, F.C. DNA probes for inefectious disease. Boca Raton, CRC Press Inc., 1989, 0.43-52.
- HILL, W.S.; KEASLER, P.; TRUCKESS, W.; FENG, P.; KAYSNER, A.; LAMOEL, K.A. A polymerase chain reaction for identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. Appl. Environ. Microbiol., v.57, n.6, p.707-711, 1991.
- HILL, W.S.; KEASLER, P. Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.12, n.1, p. 67-76, 1991
- HIGGINS, D.L.; ROBISON, B.J. Comparison of Micro-ID *Listeria* method with the conventional biochemical methods for identification of *Listeria* isolated from food and environmental samples: collaborative study. J.AOAC Intern., Arlington, v.76, n.4, p.831-838, 1993.
- HUMBERT, F., SALVAT, G., LALANDE, F., COLIN, P. E LAHELLEC, C. Rapid detection of *Salmonella* from poultry meat products using "1-2 Test^R". Lett. Appl. Bacteriol., Oxford, v.10, n.6, p.245-249, 1990.
- IBRAHIM, G.F. A review of imunnoassays and their application to *Salmonella* detection in foods. J.Food Prot., Ames, v.49, p.299- , 1986.
- INGHAM, S.C., MOODY, M.W. Enumeration of aerobic plate count and *E.coli* during blue crab processing by standard methods, PetrifilmTM and RedigelTM. J. Food Prot., Ames, v.53, n.5, p.423-424, 1990.
- INTERNATIONAL COMMISSION FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. 2ed. University of Toronto Press, Toronto, 1978.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. General guidance on methods for the detection of *Salmonella*, revisison of second edition (ISO-DIS 6579. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1991.
- IZAT, A.L; DRIGGERS, C.D.; COLBERG, M.; REIBER, M.A.; ADAMS, M.H. Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* in poultry cascasses and processing waters. J. Food. Prot., Ames, v.52, p.564-570, 1989.
- JACKSON, B.J.; BROOKINS, A.M.; TETREAULT, D.; COSTELLO, K. Detection of *Listeria* in food and environmental samples by imunnomagnetic bead capture and by cultural methods. J. Rapid Methods Automation Microbiol., Trumbull, v.2, n.1, p.39-54, 1993.

- JARVIS, B. Food Microbiology into the twenty first century; a Delphi's forecast. In: ROBERTS, T.A.; SKINNER, F.A. Food Microbiology: advances and prospects. Academic Press, 1983, p.333-337.
- JARVIS, B. A philosophical approach to rapid methods for industrial food control. In: HABERMEHL, K.O. Rapid methods and automation in microbiology and immunology. Springer-Verlag, New York, 1984. p.593-602.
- JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; ANDREWS, W.H. Comparison of two enzyme immunoassays for recovery of *Salmonella* spp. from four low moisture foods. J. Food Prot., Ames, v.55, n.8, p.601-604, 1992.
- KELLY, M.T.; LATIMER, J.M. Comparison of the Automicrobic System with API, Enterotube, Micro-ID, Micromedia Systems, and conventional procedures for identification of Enterobacteriaceae. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.12, n.5, p. 659-662, 1980.
- KENNEDY, J.E.; OBLINGER, J.L. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. J. Food Prot., Ames, v.48, n.3, p.334-340, 1985
- KOBURGER, J.A.; MILLER, M.L. Enumeration of a fluorogenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. J. Food Prot., Ames, v.48, n.3, p.244-245, 1985
- KOCH, W.H.; PAYNE, W.L.; WENTZ, B.A.; CEBULA, T.A. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.59, n.2, p.556-560, 1993.
- LAROCCO, K.A.; LITTEL, K.J.; PIERSON, M.D. THE bioluminescent assay for determining the microbial quality of foods. : PIERSON, M.D.; STERN, N.J. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology. Marcel Dekker, New York, 1986. p. 145-174.
- LEE, H.A.; WYATHH, G.M.; BRABHAM, S.M.; MORGAN, M.R.A. Enzyme linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.56, p.1541-1546, 1990.
- LEITE, C.Q.F.; LACAVA, P.M.; YOKOYA, F. Emprego da membrana filtrante para enumeração rápida de *Escherichia coli* na clara e no ovo líquido. Rev. Microbiol., São Paulo, v.22, n.2, p.122-126, 1991.

- LUK, J.M.C.; LINDBERG, A.A. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. *J. Immun. Meth.*, v.137, p.1-8, 1991.
- MACXY, R.B. Non-lethal injury and limitations of recovery of coliform organisms on selective media. *J. Milk Food Technol.*, Ames, v.33, p.445-448, 1979.
- MANNINEN, M.T.; FUNG, D.Y.C. Use of spiral plater and laser colony scanner for enumeration of microorganisms in meat. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, Trumbull, v.1, n.1, p.41-57, 1992.
- MANNINEN, M.T.; FUNG, D.Y.C.; HART, R.A. Spiral system and laser colony scanner of enumeration of microorganisms. *J. Food Safety*, Trumbull, v.11, n.2, p.177-187, 1991.
- MANSFIELD, L.; FORSYTHE, S.J. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.16, p.122-125, 1993.
- MATNER, R.R., FOX, T.L., MCIVER, D.E., CURIALE, M.S. Efficacy of the Petrifilm™ *E.coli* count plates for *E.coli* and coliform enumeration. *J. Food Prot.*, Ames, v.53, n.2, p.145-150, 1990.
- MAXCY, R.B.; PAUL, R.J. Evaluation of the microbial quality of milk. *J. Food Prot.*, Ames, v.50, n.1, p.47-50, 1987.
- McALLISTER, J.S., RAMOS, M.S., FOX, T.L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. *Dairy Food Environ. Sanit.*, Ames, v.7, n.12, p.632-635, 1987.
- McALLISTER, J.S., STADTHERR, M.P., FOX, T.L. Evaluation of the 3M Petrifilm™ culture plate method for enumerating aerobic flora and coliforms in poultry processing facilities. *J. Food Prot.*, Ames, v.51, n.8, p.658-659, 1988.
- McGOLDRICK, K.F., McALLISTER, J.S. Dry medium for detecting contamination on surfaces. *Food Technol.*, Chicago, v.40, n.4, p.77-80, 1986.
- MINISTER OF SUPPLY AND SERVICES CANADA. Compendium of Analytical Methods. Vol.1,2,3,4. Official Methods of Microbiological Analysis of Food. Polyscience Publications Inc., Ottawa, 1989.
- MINNICH, S.A.; HARTMAN, P.A.; HEIMSCH, R.C. Enzyme immunoassay for detection of *Salmonellae* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.42, p.377-383, 1985.

- MOBERG, L.J.; WAGNER, M.K.; KELLEN, L.A. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods: collaborative study. J.Assoc.Off.Anal.Chem., Arlington, v.71, n.3, p.589-602, 1988
- MOBERG, L.J. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in food. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.50, n.6, p.1383-1387, 1985.
- MOTES JR, M.L.; PEELER, J.T. Field evaluation of the MUG assay for enumerating *Escherichia coli* in seawater and oysters from southeastern United States. J.Food Prot., Ames, v.54, n.4, p.246-248, 1991
- NATH, E.J., NEIDERT, E. E RANDALL, C.J. Evaluation of enrichment protocols for the 1-2 TestTM for *Salmonella* detection in naturally contaminated foods and feeds. J. Food Prot., Ames, v.52, n.7, p.498-499, 1989.
- NELSON, C.L., FOX, T.L., BUSTA, F.F. Evaluation of dry medium film (Petrifilm VRB) for coliform enumeration. J. Food Prot., Ames, v.47, n.7., p.520-525, 1984.
- NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.12, n.1, p.91-102, 1991.
- NUTTING, L.A.; LOMOT, P.C.; BARBER, F.W. Estimaton of coliform bacteria in ice-cream by use of the membrane filter. Appl.Microbiol., Washington, v.39, n.6, p.1138-1143, 1980.
- OGDEN, I.D. A conductance assay for the detection and enumeration of *Escherichia coli*. Food Microbiol., London, v.10, n.4, p.321-327, 1993.
- OGDEN, I.D.; WATT, A.J. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.13, n.6, p.211-215, 1991.
- OGGEL, J.J., NUNDY, D.C. E RANDALL, C.J. Modified 1-2 TestTM System as a rapid screening method for detection of *Salmonella* in foods and feeds. J.Food Prot., Ames, v.53, n.8,p.656-657, 1990.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., MATNER, R. An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M PetrifilmTM test kit - HEC - for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot., Ames, v.53, n.11, p.936-940, 1990.

- PARMAR, N.; EASTER, M.C.; FORSYTHE, S.J. The detection of *Salmonella enteritidis* and *S.typhimurium* using immunomagnetic separation and conductance microbiology. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.15, n.2, p.175-178, 1992
- PETERKIN, P.I.; SHARPE, A.N. Filtering out debris before microbiological analysis. Appl. Environm. Microbiol., Washington, v.42, n.1, p.63-65, 1981.
- PETERSON, E.H.; NIERMAN, M.L.; RUDE, R.A.; PEELER, J.T. Comparison of AOAC method and fluorogenic (MUG) assay for enumerating *Escherichia coli* in foods. J. Food Sci., Chicago, v.52, n.2, p.409-410, 1987.
- PETTIPHER, G.L., WATTS, Y.B.; LANGDORF, S.A.; KROLL, R.G. Preliminary evaluation of COBRA, an automated DEFT instrument, for the rapid enumeration of micro-organisms in cultures, raw milk, meat and fish. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.14, n.8, p.206-209, 1992.
- PHILIPS, J.D.; GRIFFITHS, M.W. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelflife of pasteurized milk and cream. Food Microbiol., London, v.2, n.1, p.39-43, 1985.
- PITON, C., GRAPPIN, R. A model of statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods: application to dry rehydratable film methods and IDF reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.74, n.1, p.92-103, 1991.
- POELMA, P.L.; WILSON, C.R.; ANDREWS, W.H. Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture foods. J.Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, v.70., n.6, p.991-993, 1987.
- POULIS, J.A.; de PIJPER, M., MOSSEL, D.A.A.; DEKKERS, P.P.A. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.20, n.2, p.109-116, 1993.
- PRENTICE, G.A.; NEAVES, D.I.; JERVIS, D.I.; EASTER, M.C. In: STANNARD, C.J.; PETTIT, S.B.; SKINNER, F.A. eds. Rapid methods in Foods, Beverages and Pharmaceuticals. Soc. Appl.Bacteriol. Tech. Ser. n° 25, Academic Press, London, UK. 1989. p.155-164.

- RESTAINO, L., LYON, R.H. Efficacy of PetrifilmTM VRB for enumerating coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. J. Food Prot., Ames, v.50, n.12, p.1017-1022, 1987.
- ROBINSON, B. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. App. Environ. Microbiol., Washington, v.48, n.2, p.285-288, 1984.
- RODRIGUEZ-OTERO, J.L.; HERMIDA, M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. Total bacterial count in raw milk using the BactoScan 8000. J. AOAC Intern., Arlington, v.76, n.4, p.838-850, 1993.
- ROHM, H.; LECHNER, F.; LEHNER, M. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.11, n.3, p.213-224, 1990.
- SARHAN, H.R.; FOSTER, H.A. A rapid fluorogenic method for the detection of *Escherichia coli* by production of β -glucuronidase. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.70, n.6, p.394-400, 1991.
- SARTORY, D.P.; HOWARD, L. A medium detecting beta-glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.15, n.7, p.272-276, 1992.
- SCHALKOWSKY, S. Plating Systems. In: PIERSON, M.D., STERN, N.J. eds. Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology. New York, Marcel Dekker, 1986. p.16-26.
- SCHLEIFER, K.H. DNA probes in food microbiology. Food Biotechnol., New York, v.1, n.4, p. 585-598, 1990.
- SENYK, G.F., KOZLOWSKY, S.M., NOAR, P.S., SHIPE, P.S., BANDLER, D.K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci., Champaign, v.70, n.12, p.1152-1158, 1987.
- SHARPE, A.N. Developments in rapid methods for detection of agents of foodborne disease. Food Res. Intern., Ottawa, v.27, n.3, p.237-243, 1994.
- SHARPE, A.N.; JACKSON, A.K. Automation requirements in microbiological quality control of foods. In: HEDEN, C. e ILLENI, T., eds. Automation in Microbiology and Immunology. New York, 1975, p.117-124.
- SHARPE, A.N.; MICHAUD, G.I. Hydrophobic grid-membrane filters: new approach to microbiological enumeration. Appl. Microbiol, Washington, v.28, p.223-225, 1974.

- SHARPE, A.N.; PETERKIN, P. Membrane filter food microbiology. Innovation in Microbiology Research Studies Series, Research Studies Press, Letchworth, UK, 1988.
- SIEGEL, S. Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento). Ed. McGraw-Hill. São Paulo, 1975. 350p.
- SKJERVE, E.; OLSVIK, O., Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. Intern. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.14, n.1.p.11-18, 1991;
- SKJERVE, E.; RORVIK, L.M.; OLSVIK, O. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.56, p.3478-3481, 1990.
- SMITH, L., FOX, T.L., BUSTA, F.F. Comparison of a dry medium culture plate (Petrifilm SM plates) method to the aerobic plate count method for enumeration of mesophilic aerobic colony-forming units in fresh ground beef. J. Food Prot., Ames, v.48, n.12, p.1044-1045, 1985.
- SMITH, L.B., ZOTTOLA, E.A., FOX, T.L., CHAUSSE, K. Use of PetrifilmTM to evaluate the microflora of frozen dessert mixes. J. Food Prot., Ames, v.52, n.8, p.549-551, 1989.
- SMITH, P.J.; BOARDMAN, A.; SHUTT, P.C. Detection of *Salmonella* in animal feeds by electrical conductance. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.67, n.11, p.575-588, 1989.
- ST. CLAIR, V.J. E KLENK, M.M. Performance of three methods for the rapid identification of *Salmonella* in naturally contaminated foods and feeds. J. Food Prot., Ames, v.53, n.11, p.961-964, 1990.
- STANNARD, C.J.; WOOD, J.M. The rapid estimation of microbial contamination of raw meat by measurement of adenosine triphosphate (ATP). J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.55, p.429-438, 1983a.
- STEWART, G.S.A. In-vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.10, n.1, p.1-8, 1990.
- STEWART, G.S.A.; SMITH, T.; DENYER, S. Genetic engineering of bioluminescent bacteria. Food Sci. Technol. Today, v.3, n.1, p. 19-22, 1989.

- SUHREN, G. Automatic fluorescent microscopic count of bacteria (Bactoscan). In: Modern Microbial Methods for Dairy Products. Preceedings of Seminar, Santander, Spain. International Dairy Federation, Special Issue 8901, Brussels, Belgium, 1989. p.184-200.
- SWAMINATHAN, B.; KONGER, R.L. Immunnoassays for detecting foodborne bacteria and microbial toxins. In; PIERSON, M.D.; STERN, N.J. Foodborne microorganisms and their toxins; developing methoddology. New York, Maecel Dekker, Inc., 1986. p.253-282.
- TODD, E.C.D.; MACKENZIE, J.M.; PETERKIN, P.I. Development of an enzyme linked antibody hydrophobic grid membrane filter method for the detection of *Salmonella* in foods. Food Microbiol, v.10. p.87-99, 1993
- TODD, E.C.D.; SZABO, R.A.; PETERKIN, P.I.; SHARPE, A.N.; PARRINGTON, L.; BUNDLE, D.; GIDNEY, M.A.J.; PERRY, M.B. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzymelabeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.54, p.2536-2540, 1988.
- TSAI, W.L.; MILLER, C.E.; THOMAS, M.; RICHTER, E.R.; McQUATTIE, R. Evaluation of 25g 3M PetrifilmTM KIT-HEC and 375g composites of the Organon Teknika EHEC-TEKTM elisa method for detecting *E.coli* O157:H7 in raw ground beef. (submitted), 1994.
- TSEN, H.y.; WANG, S.J.; ROE, B.A.; GREEN, S.S. DNA sequence of a *Salmonella*-specific fragment and the use of oligonucleotide probes for *Salmonella* detection. Appl. Microbiol. Technol., v.35, p339-347, 1991.
- TURPIN, P.E.; MAYCROFT, K.A.; BEDFORD, J.; ROWLANDS, C.L.; WELLINGTON, E.M.H. A rapid luminescent-phage based MPN method for the enumeration of *Salmonella typhimurium* in environmental samples. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.16, n.1, p.24-27, 1993
- UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. 7.ed. AOAC. Washington, 1992. 529p.
- UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. 7.ed. AOAC. Washington, 1992.
- VAN CROMBRUGGE, J.; WAES, G.; REYBROEK W. The ATP-F test for estimation of the bacteriological quality of raw milk. Neth. Milk Dairy J., Amsterdam, v.43, p.347-353, 1989.

- VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment procedure for the isolation of *Salmonella*: a review. J. Appl. Bacteriol. v.54, n.1, p.69-76, 1983.
- WAES, G.M.; BOSSUIT, R.G. Impedance measurements to detect bacteriophage problems in cheddar cheese. J. Food Prot., Ames, v.47, n.3, p.349-351, 1984.
- WAKABAYASHI, W., MIYAO, S. Evaluation of the Petrifilm SM, Spiral plating, Pro.media MT-21 and Colilert methods for obtaining bacterial and total coliforms counts in pickled vegetables. J. Jap. Soc. Food Sci. Technol., Tokyo, v.40, n.5, p.348-352, 1993.
- WANG, R.F.; CAO, W.W.; JOHNSON, M.G. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.59, n.9, p.2827-2831, 1992.
- WERNARS, K.; HEUVELMAN, T.; CHAKRABORTY, T.; NOTERMANS, S.H.W. Use of the polimerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.70, n.2, p.121-126, 1991.
- WHITE, C.H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, v.76, n.10, p.3126-3132, 1993.
- WOLCOTT, M.J. DNAbased rapid methods for the detection of foodborne pathogens. J. Food Prot., Ames, v.54, n.5, p.387-401, 1991.
- ZINDULIS, J. A medium for the impedimetric detection of yeasts in foods. Food Microbiol., London, v.1, n.2. p.159-167, 1984

Resumo

Esse trabalho foi subdividido em três partes. Na primeira parte foram apresentados os principais métodos rápidos para análise microbiológica de aplicação na área de alimentos, fazendo-se uma análise crítica de suas características e suas vantagens e desvantagens quando comparados aos métodos analíticos convencionais. Os métodos rápidos, apresentados nesse estudo, foram agrupados em 7 categorias: 1 - técnicas envolvidas com o preparo do material necessário para uma análise microbiológica; 2 - técnicas de microscopia; 3 - métodos alternativos para contagem de microrganismos viáveis; 4 - técnicas indiretas para enumeração de microrganismos viáveis; 5 - técnicas genéticas; 6 - técnicas imunológicas; 7 - métodos miniaturizados para identificação de microrganismos.

Na segunda parte foram apresentados resultados de um estudo no qual se avaliou a técnica Petrifilm (3M do Brasil Ltda) para enumeração rápida de bactérias totais, de coliformes totais e de bolores e leveduras em alimentos de origem animal e vegetal consumidos em São Paulo, SP. Entre os alimentos estavam produtos cárneos crus e processados (24 amostras). leite pasteurizado (11 amostras), queijos (18 amostras) e vegetais crus (10 amostras). Após adequada homogeneização e diluição decimal seriada das amostras, efetuou-se a contagem de bactérias totais, coliformes totais e bolores e leveduras por plaqueamento nas placas Petrifilm, de acordo com instruções do fabricante (3M do Brasil, Ltda.), e nas placas convencionais, de acordo com BAM/AOAC. A análise estatística ($\alpha=0,5\%$) dos dados obtidos indicou que os resultados obtidos pelos dois métodos foram equivalentes, excetuando-se as contagens de coliformes totais em vegetais, que, nas placas Petrifilm foram inferiores às obtidas nas placas convencionais.

Na terceira parte do trabalho foram apresentados resultados de um estudo de avaliação do kit *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., WA, EUA) para pesquisa de salmonelas móveis em produtos cárneos suínos. Para a avaliação do kit, 100 amostras de carne suína crua e 63 de linguiça de suíno, coletadas em açougues de Santo André, SP, foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* simultaneamente por dois métodos de cultivo convencionais (BAM/AOAC, 1992 e ISO, 1991) e pelo kit *Salmonella* 1-2 Test utilizando o protocolo de enriquecimento proposto pelo fabricante e também utilizando um protocolo de enriquecimento modificado. Os resultados indicaram que das 25 amostras positivas para *Salmonella*, apenas 2 foram positivas utilizando o kit conforme protocolo do fabricante. Utilizando-se o protocolo modificado, 7 amostras foram positivas. As metodologias convencionais BAM/AOAC, 1992, e ISO, 1991 detectaram 8 e 21 amostras positivas para *Salmonella*, respectivamente. Somente uma das amostras positivas para *Salmonella* foi positiva pelos quatro métodos empregados. A baixa eficiência do kit *Salmonella* 1-2 Test, que está em desacordo com os resultados reportados pela maioria dos trabalhos publicados a esse respeito, foi associada à perda da atividade do antisoro que compõe o kit durante transporte e armazenamento antes do uso.

Summary

This report comprises three parts. In the first part, the author presents and analyses the most important rapid methods for microbiological analysis of food. Rapid methods were classified in 7 main categories: 1 - methods involved with sample preparation; 2 - microscopy methods; 3 - new methods for plating and counting; 4 - indirect methods for viable counting; 5 - genetic techniques; 6 - immunological methods; 7 - miniaturized procedures for identification of microorganisms.

In the second part, results of the evaluation of Petrifilm system for enumeration of total bacteria, total coliforms and yeasts and molds in food consumed in São Paulo, SP., are presented and discussed. Food samples included raw and processed meat products (24 samples), pasteurized milk (11 samples), cheese (18 samples) and raw vegetables (10 samples). After proper homogenization and decimal dilution, samples were plated on Petrifilm aerobic count plates, Petrifilm total coliforms plates and Petrifilm yeasts and molds plates, according to 3M Co, Inc., and also plated on conventional plates, according to BAM/AOAC. Statistical analysis ($\alpha=0.5\%$) of data indicated that results obtained in Petrifilm plates were equivalent to the ones obtained by conventional procedures, except for raw vegetables. In these products, Petrifilm counts were lower than the ones in conventional plating.

In the third part, results of the evaluation of the kit *Salmonella* 1-2 Test (BioControl Systems, Inc., WA, USA) for rapid detection of motile *Salmonella* in raw pork products are presented and discussed. 100 raw pork meat and 63 raw pork sausages, purchased in Santo Andre, SP., were submitted to detection of *Salmonella* using the conventional procedures proposed by BAM/AOAC, 1992, and by ISO, 1991, and using the *Salmonella* 1-2 Test kit, following the sample enrichment protocol recommended by the producer and a modified enrichment protocol. Results indicated that, among 25 samples positive for *Salmonella*, only 2 were positive when the producer's protocol was followed. When the modified enrichment protocol was used, the number of *Salmonella* positive samples increased to 7. Using conventional procedures, 8 samples were positive by BAM/AOAC, 1992 method, and 21 by ISO, 1991 method. Only one *Salmonella* positive sample was positive by the four methods simultaneously. The low efficiency of *Salmonella* 1-2 Test kit was probably due to loss of activity of antiserum during transport and storage of kits before use.