



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA
DETECÇÃO DE SALMONELLA SP E LISTERIA
MONOCYTOGENES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS.**

DOUTORANDO

Paulo Rogério Franchin

ORIENTADORA

Prof.^a Cleide Rosana Vieira Batista, PhD

FLORIANÓPOLIS-SC
2008

PAULO ROGÉRIO FRANCHIN

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA
DETECÇÃO DE SALMONELLA SP E LISTERIA
MONOCYTOGENES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^aCleide Rosana Vieira Batista, PhD

**FLORIANÓPOLIS-SC
2008**

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DE
SALMONELLA SP E LISTERIA MONOCYTOGENES EM CARNES E PRODUTOS
CÁRNEOS**

Por

Paulo Rogério Franchim

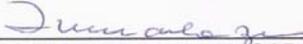
Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela
Comissão formada por:

Presidente:



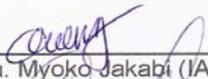
Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista (UFSC)

Membro:



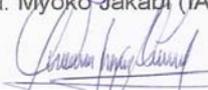
Dra. Ivone Delazari (SADIA/SP)

Membro:



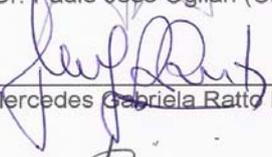
Dra. Myoko Jakabi (IAL/SP)

Membro:



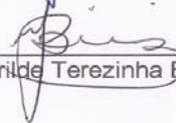
Prof. Dr. Paulo José Ogliari (UFSC)

Membro:



Profa. Dra. Mercedes Gabriela Ratto Reiter (FURB)

Coordenadora:



Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Florianópolis, 26 de agosto de 2008.

Agradecimentos

A minha esposa Adriana, sempre presente e disposta, lutadora e incentivadora;

Aos meus filhos Paula, Lucas e Daniela, a quem devo desculpas por várias ausências;

Meu pai Pedro e mãe Tereza sempre me aconselhando e dando forças .

Aos amigos do laboratório (Giovana Lemos, Ivair Gonçalves, Cristiane Moraes, Patrícia Dávila Moises, Vilmar Toffoli, Graziela Strider), excelentes profissionais, pela colaboração incondicional.

Registro o estímulo me dado pela Empresa Perdigão S/A, na pessoa do Sr. Joaquim G. Nunes, que tornou este projeto possível.

A minha orientadora, Dra. Cleide Rosana Vieira Batista que com paciência me levou até o fim, para um novo começo.

Ao Professor Dr. Paulo J. Ogliari pela dedicação e paciência interminável.

Aos funcionários e professores do Centro de Ciências Agrárias que nunca me faltaram.

Franchin, P. R. Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

Com o objetivo de validar metodologias analíticas alternativas para detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* em amostras de carcaças de frango, carnes suínas cruas e, derivados cárneos processados naturalmente contaminados, foram analisadas 503 amostras para detecção de *Salmonella* spp e 334 amostras para detecção de *L. monocytogenes*.

Na análise de *Salmonella* spp em amostras de carnes suínas e carcaças de frango, o método AOAC 993-07 (MSRV Acumedia), apresentou maior sensibilidade, seguido do método PCR BAX System[®], do Método AOAC 993-07 (MSRV Oxoid) e, do método de referência ISO 6579. Segundo o teste não paramétrico de McNemar, há diferença significativa na comparação do método AOAC 993-07 (MRSV Acumedia) e o método ISO 6579, entre o método ISO 6579 e o método BAX System[®], entre o método AOAC 993-07 (MRSV Oxoid) e o BAX System[®] e entre os métodos AOAC 993-07 entre si. Não houve diferença significativa entre os métodos Bax System[®] e AOAC 993-07 (MRSV Acumedia), e ISO 6579 versus o método 993-07 (MRSV Oxoid).

Para a análise de *L. monocytogenes* em amostras de carnes cruas e produtos processados o método BAX System[®] apresentou maior sensibilidade, seguido pelo método ISO 11290-1/A1, USDA/FSIS modificado e ISO modificado. Há diferença significativa entre os métodos ISO 11290-1/A1 e o BAX System[®], ISO modificado e o método BAX System[®] e entre o método USDA/FSIS modificado e o BAX System[®]; Não há diferença significativa entre os métodos ISO 11290-1/A1 e o método USDA/FSIS modificado, entre o método ISO 11290-1/A1 e o método ISO 11290-1/A1 modificado, e, finalmente, entre os métodos ISO 11290-1/A1 modificado e USDA/FSIS modificado.

Avaliou-se também a aplicação do Teste de McNemar para a comparação de proporções em amostras dependentes para verificar a conveniência da substituição de um método convencional por um novo, na identificação da presença de *Salmonella* spp. Resultado deste estudo mostrou que o Teste de McNemar nem sempre é suficiente para a tomada de decisão final do pesquisador em amostras naturalmente contaminadas e que funções apropriadas das proporções necessitam ser estimadas. Neste sentido, o Poder de Teste de McNemar (1 - erro tipo II) foi aqui também estudado no capítulo 4.

.Palavras chaves: Métodos ISO, AOAC, USDA/FSIS, BAX System[®], *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, carnes e produtos cárneos

ABSTRACT

In order to evaluate alternative analytical methodology for *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* detection in samples from chicken carcasses, raw pork meat and processed meat derivatives naturally contaminated, 503 samples were analyzed for *Salmonella* spp detection and other 334 samples for *L. monocytogenes* detection.

In analysis for *Salmonella* spp in samples from pork meat and chicken carcasses, the AOAC 993-07 (MSRV Acumedia) method presented higher sensitivity, followed by the PCR BAX System[®] method, the AOAC 993-07 (MSRV Oxoid) method and the reference method ISO 6579. According to the non parametric test from McNemar, there is a significant difference when compared to the AOAC 993-07 (MRSV Acumedia) and ISO 6579 methods, between ISO 6579 and BAX System[®] methods, between the AOAC 993-07(MRSV Oxoid) and the BAX System[®] and, between AOAC 993-07 methods amongst themselves. There isn't a significant difference when compared the Bax System[®] and AOAC 993-07 (MSRV Acumedia) and between ISO 6579 and the 993-07 method (MSRV Oxoid).

For the *L. monocytogenes* analysis in raw meat and processed products samples the Bax System[®] method presented higher sensibility, followed by the ISO 11290-1/A1, USDA/FSIS modified and the ISO modified. There is a significant difference between the ISO 10290-1/A1 method and the BAX System[®], modified ISO and the BAX System[®] and between the modified USDA/FSIS and the BAX System[®]; There is no significant difference between the ISO 11290-1/A1 and the USDA/FSIS modified methods, between the ISO 11290-1/A1 method and the modified ISO 11290-1/A1 method, and finally between the modified ISO methods and the modified USADA/FSIS.

The McNemar test application was also evaluated for the dependent samples proportions comparison in order to verify the convenience of the substitution for a conventional method for a new one, for the identification of *Salmonella* spp presence. Results from this study showed that the McNemar Test is not always sufficient for a final decision making from the researcher in naturally contaminated samples and that appropriated functions from the proportions needed to be estimated. This way, the McNemar test Power (1 - error type II) was here studied in chapter 4.

Keywords: Métodos ISO, AOAC, USDA/FSIS, BAX System[®], *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* meat and meat products, broiller carcasses

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 OBJETIVO GERAL	4
1.1 Objetivos Específicos	4

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1 SALMONELLA	7
1.1 Métodos e meios para isolamento de <i>Salmonella</i> spp	9
2 LISTERIA MONOCYTOGENES	18
2.1. Métodos para Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
2.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase	25
3. TESTE DE HIPÓTESES SOBRE PROPORÇÕES EM AMOSTRAS DEPENDENTES	28
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

CAPÍTULO 2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO E CARNES SUÍNAS, NATURALMENTE CONTAMINADAS	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Amostras	41
2.2 Pré-enriquecimento das amostras para análise de <i>Salmonella</i> spp	42
2.3 Detecção de <i>Salmonella</i> spp pelo método da AOAC 993-07/995-07 (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado – Oxoid e Acumedia).....	42
2.4 Detecção de <i>Salmonella</i> spp. pelo método ISO 6579.	43
2.5 Detecção de <i>Salmonella</i> spp pelo BAX System®.	43
2.6 Análise estatística	44
3 RESULTADOS	48
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES	57
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

CAPÍTULO 3 Comparação do sistema BAX® com o método MSRV para detecção de <i>Salmonella</i> spp em carcaça de frango e carnes suínas	61
“Comparison of the BAX System® with the MSRV method for the detection of Salmonella in chicken carcasses and pork meat”.	61

CAPÍTULO 4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS	68
“STATISTICAL METHODOLOGY FOR PATHOGEN DETECTION”.....	68

CAPÍTULO 5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 MODIFICADO, USDA/FSIS MODIFICADO E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS NATURALMENTE CONTAMINADAS.....		73
1 INTRODUÇÃO		74
2 MATERIAL E MÉTODOS		75
2.1 Amostras		75
2.2 Método ISO 11290-1/A1.....		75
2.3 Método ISO11290-1/A1 modificado (1)		76
2.4 Método PCR BAX <i>System</i> ® segundo protocolo do fabricante		77
2.5 Método USDA/FSIS modificado		78
2.6 Análise estatística		78
3 RESULTADOS.....		85
4 DISCUSSÃO		93
4 CONCLUSÕES		98
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		100
7 CONCLUSÕES		102
8 TRABALHOS FUTUROS.....		104

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE SALMONELLA SP EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO E CARNES SUÍNAS, NATURALMENTE CONTAMINADAS..... 39

Figura 1: Fluxograma para a detecção de *Salmonella* spp pelos métodos ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 e BAX System® (DuPont-Qualicom)... 46

CAPÍTULO 5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 MODIFICADO, USDA/FSIS MODIFICADO E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS NATURALMENTE CONTAMINADAS..... 73

Figura 1. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método ISO 11290-1/A1..... 80

Figura 2. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método ISO 11290-1/A1 Modificado. 81

Figura 3. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo BAX System® 82

Figura 4. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método USDA/FSIS Modificado..... 83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO E CARNES SUÍNAS, NATURALMENTE CONTAMINADAS.39

Tabela 1: Cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa na detecção de <i>Salmonella</i> spp.	47
Tabela 2: Detecção de <i>Salmonella</i> sp em carcaças de frango e carnes suínas pelas metodologias ISO 6579, AOAC 993-07 (Oxoid) e AOAC 993-07 (Acumedia) e Bax System®.....	51
Tabela 3: Resultados estatísticos da detecção de <i>Salmonella</i> spp em amostras de carcaças de frango e carnes suínas pelas metodologias ISO 6579, AOAC 993-07 (Oxoid), AOAC 993-07 (Acumedia) e Bax System®.	51

CAPÍTULO 3 Comparação do sistema BAX® com o método MSRV para detecção de Salmonella sp em carcaça de frango e carnes suínas.....61 **“Comparison of the BAX System® with the MSRV method for the detection of Salmonella in chicken carcasses and pork meat”61**

Tabela 1: Results for <i>Salmonella</i> sp in naturally contaminated chicken carcasses and pork meat determined with the BAX System® and MSRV method”.....	64
Tabela 2: “Concordance, sensitivity, specificity, false positive rate and false negative rate for <i>Salmonella</i> sp in naturally contaminated chicken carcasses and pork meat determined with the BAX System® and MSRV method”.....	64

CAPÍTULO 4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS. .68 **“STATISTICAL METHODOLOGY FOR PATHOGEN DETECTION”68**

Tabela 1 “Number (proportions) of the presence of <i>Salmonella</i> indicated by the two methods in 200 samples of contaminated chicken-derived products”.....	70
--	----

CAPÍTULO 5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 MODIFICADO, USDA/FSIS MODIFICADO E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM CARNES E PRODUTOS CÂRNEOS NATURALMENTE CONTAMINADAS73

Tabela 1: Cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa na detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	84
Tabela 2: Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> pelas metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®. .	90
Tabela 3. Resultados estatísticos da detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de salsichas resfriadas, bacon, carcaças de frango resfriado e carnes suínas cruas pelas metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®.....	91
Tabela 4. Detecção de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de salsichas resfriadas, bacon, carcaças de frango resfriado e carnes suínas cruas pela combinação	

das metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®	91
Tabela 5. Identificação de <i>Listeria</i> spp a partir da reação de esculina de isolados obtidos pela metodologia ISO 11290-1/A1 e USDA/FSIS modificado.	92

INTRODUÇÃO

Os consumidores esperam que os alimentos estejam livres de qualquer agente contaminante que lhes possam causar danos a saúde, seja este contaminante físico, químico ou biológico.

A produção e a industrialização de alimentos isentos de bactérias patogênicas se tornam difíceis na prática, mesmo com a aplicação das Boas Práticas de Manufatura e dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional nas indústrias de alimentos, que são as bases essenciais da segurança da qualidade para programas como APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) (SALLES, et al., 2002).

Também, restrições tecnológicas, mesmo em processos conduzidos dentro das normas de higiene, possibilitam a sobrevivência de patógenos naturalmente presentes no alimento e no ambiente. Embora nestes casos o número destes patógenos seja pequeno, eles podem ser detectados em meios de cultivos adequados.

Dentre os principais patógenos encontrados em diversos tipos de alimentos, destacam-se *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, reconhecidamente causadores de enfermidades transmitidas por alimentos.

Salmonella sp é um microrganismo amplamente difundido na natureza, sendo o homem e animais seus principais reservatórios naturais (JAY; 2005). A salmonelose é uma infecção de caráter agudo ou crônico, apresentando-se como uma gastroenterite, febre entérica e septicemia (ICMSF; 1996) e muitas vezes relacionada ao consumo de carnes cruas, principalmente de aves, ovos e produtos derivados.

As manifestações associadas com *Listeria monocytogenes* incluem desde sintomas semelhantes a um simples resfriado com febre baixa e mal estar, que pode passar despercebido, ou evoluir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro. Idosos, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos são mais susceptíveis a doenças causadas por *Listeria monocytogenes* (McLAUHLIN; 1997).

Listeria monocytogenes está distribuída amplamente no ambiente; se encontra em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição. É comum no

intestino de humanos e animais domésticos, produtos agrícolas frescos e meio ambiente da área de processamento na indústria (TOMPKIN et al., 2001). Esta bactéria têm sido isoladas de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados em vários países, incluindo o Brasil (FRANCO & LANDGRAF; 2003).

Listeria é uma bactéria capaz de se desenvolver lentamente em temperaturas de refrigeração, mas é sensível a baixos valores de pH de alimentos ácidos (iogurte e algumas frutas) e ao calor, sendo facilmente destruída pelo cozimento convencional. Pelo fato de se encontrar em qualquer ambiente frio e úmido, pisos molhados e outras superfícies freqüentemente apresentam uma alta população de espécies de *Listeria* spp. Devido ao seu alto poder de difusão, o microrganismo é constantemente reintroduzido ao meio ambiente da área de processamento na indústria. Os esforços excessivos para controlar *Listeria monocytogenes* podem reduzir o nível de contaminação, mas não se pode, com as tecnologias atuais, erradicar esse microrganismo da área de processamento na indústria, nem eliminar completamente o potencial de contaminação dos produtos terminados (TOMPKIN et al., 2001).

A necessidade dos produtores de alimentos em melhorar cada vez mais a performance de qualidade e diminuir cada vez mais a ocorrência de patógenos presentes em alimentos, faz com que também haja a necessidade paralela de melhoria tecnológica quanto à detecção de patógenos em alimentos, particularmente métodos automatizados e mais rápidos.

Atualmente, os métodos analíticos para análise de *Salmonella* spp (método ISO - International Standards Organization - 6579) e *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1/A1 e Unit States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Services (USDA/FSIS) 3ª edição, 1998) demandam tempo e trabalho para chegar ao diagnóstico final da análise, devido aos vários passos de transferência de inóculos, após incubação, necessários para a execução dos métodos mencionados.

O tempo transcorrido entre o início e fim da análise microbiológica cria uma necessidade de estocagem da produção (necessidades de frio, espaço físico, estruturas mais inchadas de logística de distribuição, etc) até que se tenha o resultado da análise para que se possa deliberar sobre o destino da produção diária dos alimentos. Deriva deste fato custos adicionais de produção, que recaem para o consumidor.

Quanto maior for o tempo da análise, maior será o tempo para a tomada de ações corretivas e preventivas em casos de desvios de qualidade do processo, quando monitorados por análises microbiológicas.

Por estas razões, a busca de novos métodos analíticos e adaptações criteriosas dos métodos já existentes que possam reduzir o tempo para o resultado final, desde que comprovada sua eficácia, levam a uma rápida resposta para a solução de possíveis problemas de ordem microbiológica durante a produção de alimentos no nível industrial, o quê, por consequência, leva a uma garantia de qualidade maior para o consumidor, além da possibilidade de diminuição de custos pela diminuição de estruturas físicas e outros recursos necessários para estocagem da produção.

Necessário também é manter o controle da prevalência de determinados patógenos, como *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, e na mudança de um método mais produtivo que outro, este fator possa ser levado em consideração não como um defeito de processo, mas sabidamente devido a eficácia da metodologia usada na pesquisa. A Norma ISO 16140:2003(E) preconiza que se façam 60 amostras por tipo de alimentos para validação de um método alternativo usando o teste de McNemar para determinar significância ou não entre os métodos testados. Introduzimos aqui o conceito do erro tipo II – Poder do Teste de McNemar - para avaliação da validação de metodologias, pois pode-se aceitar, por exemplo, que um teste novo seja aceito mesmo com diferença significativa no teste de McNemar, desde que o percentual de discordantes no teste não seja maior do que o estabelecido pelo pesquisador, o que pode perfeitamente acontecer quando o número de amostras testadas é “grande” (OGLIARI et al., 2007).

1 OBJETIVO GERAL

Comparar o desempenho entre os diferentes métodos analíticos, AOAC - Association of Official Analytical Chemists - 993-07/995-07, ISO 6579 e BAX System[®] (DuPont-Qualicom) na detecção de *Salmonella* spp e entre os métodos ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 modificado, USDA/FSIS modificado e o BAX System[®] (DuPont-Qualicom) na detecção de *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos naturalmente contaminados.

1.1 Objetivos Específicos

1.1.1 Comparar o desempenho entre os métodos ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 (avaliando-se o MSRV - Agar Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado da marca Oxoid e da marca Acumedia) e o BAX System[®] (DuPont-Qualicom), na detecção de *Salmonella* spp em amostras de carcaças de frango e carnes suínas, naturalmente contaminadas, conforme descrito abaixo:

- a) Método ISO 6579 com o BAX System[®];
- b) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid) com o BAX System[®];
- c) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o BAX System[®];
- d) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid)
- e) Método ISO 6579 e o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid);

f) Método ISO 6579 com o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia);

1.1.2 Comparar o desempenho entre os métodos ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 modificado (substituição do Caldo Fraser por Caldo MOPS-BLEB), USDA/FSIS modificado (substituição do Ágar Oxford por Agar ALOA) e o BAX System[®] (DuPont-Qualicom); na detecção de *Listeria monocytogenes* em salsichas, bacon fatiado, carcaças de frango e cortes de carne suína naturalmente contaminada, conforme descrito abaixo:

a) Método ISO 11290-1/A1 com o BAX System[®];

b) Método ISO 11290-1/A1 modificado com o BAX System[®];

c) Método ISO 11290-1/A1 com o método ISO 11290-1/A1 modificado;

d) Método USDA/FSIS modificado com o BAX System[®];

e) Método USDA/FSIS modificado com o método ISO 11290-1/A1;

f) Método USDA/FSIS modificado com o método ISO 11290-1/A1 modificado.

g) Avaliar a concordância de amostras com reação de esculina positiva ou negativa com o sucesso no isolamento de *Listeria* spp.

1.1.3 Avaliar a aplicação do Teste de McNemar para a comparação de proporções em amostras dependentes para verificar a conveniência da substituição de um método convencional por um novo, na identificação da presença de *Salmonella* spp, introduzindo o cálculo do Poder do Teste de McNemar segundo Ogliari et al., (2007) na avaliação do desempenho de novos métodos analíticos.

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 SALMONELLA

Salmonela é uma das principais bactérias envolvidas em surtos de doenças de origem alimentar como febre tifóide, febre entérica e enterocolites, sendo amplamente disseminada e apresentando grande impacto na saúde e economia mundial, tendo o homem e animais como seu principal reservatório (JAY; 2005).

Este gênero pertence à família Enterobacteriaceae e é caracterizado por um grupo de bacilos mesófilos, gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbio facultativo e na sua grande maioria produtores de gás a partir da glicose. São conhecidos 2.324 sorotipos de salmonela que são classificados de acordo com sua composição antigênica: antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (id, ibid). A classificação e a nomenclatura de salmonela sofreu várias modificações nos últimos anos e, atualmente, estão colocadas em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, com mais ou menos 2.000 sorotipos, sendo divididos em 5 subespécies ou grupos, a maioria dos quais esta classificada na chave da espécie tipo, *S. enterica*, que compreende as seguintes subespécies: grupo II (*S. enterica* subsp. *salamae*); grupo IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*); grupo IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*); grupo IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*); e o grupo VI (*S. enterica* subsp. *Indica*) (JAY; 2005). Os bacilos são normalmente móveis através de flagelos peritríquios, ainda que se possam observar mutantes imóveis, e o sorotipo Pullorum-Gallinarum é sempre imóvel (FRANCO & LANDGRAF; 2003).

O principal habitat de salmonela é o trato intestinal de animais tais como, aves, particularmente perus e galinhas, sendo muito comum também em suínos, bovinos e eqüinos. Carnes cruas e mal cozidas, leite cru, ovos e seus respectivos derivados, são veículos freqüentes do microrganismo, sendo freqüentes também as contaminações cruzadas de matérias primas e alimentos processados, tanto de origem animal como vegetal (GARRICK & SMITH; 1994).

Atualmente, *Salmonella* spp é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em surtos de doença de origem alimentar em diversos países. A preocupação com a ubiquidade de *Salmonella* spp, e com os efeitos decorrentes de sua veiculação pelos alimentos tem extensão internacional. As tentativas visando o seu controle têm mobilizado os órgãos responsáveis pela saúde pública com ponderáveis repercussões de ordem econômica, resultantes de medidas acauteladoras impostas à indústria e ao comércio local e internacional (PARDI et al., 1995). O crescente comércio internacional de animais e rações favorece a distribuição da salmonelose (BARROS et al., 2002).

A maioria de surtos de salmonelose ocorre, tipicamente, em banquetes ou no serviço de refeições coletivas. Nos Estados Unidos, foram registrados 11.834 casos de salmonelose no ano de 2008 (CDC, 2008), enquanto na Comunidade Européia, um total de 170.497 casos de salmonelose humanas foi registrado em 2005 (The European Food Safety Authority - EFSA Journal, 2008).

O hábito de consumo de brotos de sementes, por pessoas que procuram buscar energia e vitalidade pela alimentação saudável, transformou-se numa indústria rentável, porém vem ocasionando surtos com bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. Foram relatados 1.917 casos confirmados de salmonelose, associados ao consumo de brotos e sementes de alfafa e mostarda, e identificação de vários sorovares em países como o Reino Unido, Estados Unidos, Suécia, Irlanda, Canadá, entre os anos de 1988 e 1998 (BARROS et al., 2002).

As principais causas que levam ao aumento da salmonelose veiculada por alimentos são: aumento de elaboração de produtos em forma de massa, que favorece a disseminação de *Salmonella* spp; os procedimentos inadequados de armazenamento, que devido às atuais condições de vida são acumulados em excesso; o costume cada vez mais freqüente de comer produtos crus ou insuficientemente aquecidos; o aumento do comércio internacional; a diminuição de resistência às infecções, devido ao aumento dos níveis de higiene pessoal (JAY, 2005).

Jay (2005) cita ainda, a ocorrência de dois maiores surtos de salmonelose registrados nos EUA, que aconteceram em circunstâncias incomuns. O maior ocorreu em 1994 acometendo mais de 224.000 pessoas, devido à *S. Enteritidis*, atingindo 41 estados. O veículo foi sorvete produzido de leite que fora transportado em um caminhão-tanque, que anteriormente havia transportado ovo líquido. O segundo grande surto ocorreu em 1.985 e envolveu cerca de 200.000 pessoas, devido à *S. Typhimurium*, proveniente de leite semidesnatado.

Inúmeros surtos de toxinfecção alimentar causado por *Salmonella* spp são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos. Verifica-se, no entanto, que a carne de aves e outros tipos de carne são mais freqüentemente envolvidos. Salmonelose associada a laticínios, é causada por leites crus ou pasteurizado inadequadamente e também por queijo. Quanto a produtos derivados de ovos, os mais freqüentemente envolvidos em surtos são as saladas à base de ovos, sorvetes e outras sobremesas de fabricação caseira (FRANCO & LANDGRAF; 2003).

Alves et al., (2001) relataram um surto ocorrido em São Luiz no Maranhão, Brasil, onde algumas pessoas que participaram de um jantar, apresentaram quadro clínico de diarreia, mal estar, cólicas e febre, sugestivos de salmonelose. Após análise microbiológica, identificou-se o sorotipo de *Salmonella* Enteritidis.

1.1 Métodos e meios para isolamento de *Salmonella* spp

A detecção de *Salmonella* spp em alimentos é um trabalho que pode levar de 4 a 7 dias quando a análise é realizada pela metodologia tradicional ISO 6579, sendo necessários 3 a 4 dias para obtenção de resultado negativo confirmatório neste método (BENNETT et al., 1998). Para a indústria de alimentos, que retêm seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos frente a um patógeno qualquer pesquisado, este tempo pode significar perdas econômicas, o que leva o analista a buscar alternativas analíticas mais rápidas.

Em microbiologia de alimentos, a presença de um único organismo patogênico é considerada significativa, "considerando a dose infectante do agente". Portanto,

métodos e meios devem ser sensíveis o suficiente para detectar um número extremamente reduzido de células (TIEJEN & FUNG; 1995).

Procedimentos padrões para isolamento de *Salmonella* spp são especificados por organismos internacionais, como ISO (International Standards Organization), APHA (American Public Health Association), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), IDF (International Dairy Federation), BSI (British Standards) geralmente após realização de estudos colaborativos. Contudo, não existe uma única metodologia que possa ser aplicada para todos os tipos de alimentos (id, ibid).

A técnica mais utilizada para detecção de *Salmonella* spp em alimentos é o método recomendado pela APHA. É um método de cultura clássico dividido em várias etapas de subcultura que, salvo algumas variações na seleção dos meios e preparo das amostras, pode ser aplicado a qualquer tipo de alimento (SILVA & EIROA; 1993).

Os métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* spp em alimentos envolvem cinco etapas seqüenciais: a) o pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável; b) enriquecimento seletivo, no qual a amostra é novamente colocada em caldo de cultivo contendo reagentes inibitórios que permite a multiplicação de *Salmonella* spp, enquanto restringe a proliferação da maioria das outras bactérias; c) semeadura em meios sólidos seletivos que restringem a multiplicação de outras bactérias que não *Salmonellae*; d) testes bioquímicos, que fornecem dados fenotípicos da cultura isolada; e) sorotipagem para caracterização antigênica, que é o passo definitivo e provê a identificação específica da cultura isolada (BAILEY, et al., 1991).

Vários métodos têm sido propostos nesses últimos anos, destacando-se os imunoenaios enzimáticos (FLOWERS, et al., 1988; CURIALE, et al., 1990), métodos de hibridização DNA-DNA (FITTS, et al., 1983; CHAN, et al., 1990), 1-2 teste de motilidade (OGGEL, et al., 1990) e os métodos de detecção por

motilidade em meios líquidos ou semi-sólidos (CHAU & HUANG; 1976; DE SMEDT, et al., 1986; HOLBROOK, et al., 1989).

O Ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) é derivado de melhorias efetuadas ao longo do tempo no Caldo Rappaport. Segundo o Manual Difco, (1998) o caldo de Rappaport segundo Rappaport, Konforti, Navon (1956), incubado a 35°C, é baseado na habilidade de *Salmonella* spp em sobreviver em um meio de cultura de pressão osmótica relativamente elevada, capacidade de multiplicação em pH reduzido (5,2) e maior resistência ao verde malaquita, em conjunto com uma menor demanda nutricional. Algumas modificações foram introduzidas por Vassiliadis et al., (1976) no caldo Rappaport, como a redução na concentração de verde malaquita, o aumento na temperatura de incubação de 35°C para 43°C e a sua utilização após uma etapa de pré-enriquecimento. Esta modificação foi denominada meio de Rappaport-Vassiliadis que apresenta uma maior atividade inibitória sobre a microbiota competidora do que a fórmula original (XIROUCHAKI, et al., 1982; VASSILIADIS, 1983).

Em estudo realizado por Van Schothorst e Renaud (1983), o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) permitiu o isolamento de salmonela em 42 amostras ambientais, enquanto o caldo tetrionato verde brilhante e o caldo selenito-cistina detectaram apenas 60% e 29% dessas cepas, respectivamente. Kalapothaki et al., (1983) também relataram a superioridade do caldo Rappaport-Vassiliadis em relação ao caldo tetrionato verde brilhante no isolamento de *Salmonella* spp a partir de amostras de carnes.

O princípio dos meios semi-sólidos está na obtenção de uma maior especificidade e facilidade de isolamento das cepas de *Salmonella* spp porque estão combinados em um único meio de enriquecimento, o crescimento seletivo e a capacidade de produzir flagelos, característica da maioria das cepas de salmonela.

Busse, M. (1995), em uma revisão bibliográfica sobre meios de enriquecimento seletivo, concentra sua pesquisa bibliográfica no caldo RV e na sua evolução na forma do MSRV:

“Enriquecimento por motilidade é uma técnica antiga (CRAIGIE, 1931). Originalmente ele foi concebido em tubos em U, onde num lado era inoculado e após incubação as bactérias móveis poderiam ser isoladas no outro lado. Stuart e Pivnick em 1965 tentaram isolar Salmonella de fezes usando esta técnica”.

Stuart e Pivnick (1965) estudaram o caldo selenito com 1,2% de ágar, o caldo Rappaport com 0,6% de ágar e o meio modificado de Rappaport adicionado de verde brilhante substituindo o verde malaquita. Os melhores resultados foram obtidos com o meio de Rappaport adicionado de verde brilhante e foi observado que o uso deste meio seguido de isolamento em Ágar EMB (Ágar eosina Azul de Metileno), geralmente, resultava em uma colônia pura de *Salmonella* spp.

Outros autores que usaram o procedimento do tubo em “U” foram Banwart (1968), Harper & Shortrige (1969) e Fung & Kraft (1970). Chau & Huang (1974; 1976) que tentaram aperfeiçoar o método testando o efeito do pH, força iônica e a ação do trifenilmetano na motilidade de enterobactérias. Em 1974, Chau & Huang desenvolveram um meio de enriquecimento seletivo semi-sólido para tubo em “U”, para a pesquisa de *Salmonella* spp a partir de amostras fecais. Foi considerado um meio de cultura eficaz e simples, mas sua seletividade não era alta, porque permitia o desenvolvimento e migração de outras espécies bacterianas como *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*. Este efeito na seletividade foi minimizado quando, em 1976, Chau e Huang introduziram na composição do meio, verde malaquita, cloreto de magnésio e novobiocina (20µg/ml). Com o material coletado na área de migração realizavam testes sorológicos para antígenos “H” (BUSSE, M., 1995).

Apesar dos meios semi-sólidos nos tubos em “U” permitirem o isolamento de um grande número de cepas de salmonela, esses tubos apresentavam desvantagens como a necessidade de manuseio adequado, maior espaço para incubação e a limitação do seu uso devido ao formato peculiar (PERALES & AUDICANA, 1989).

Uma modificação do método foi introduzida por Goossens et al., (1984) que trocaram os tubos em “U” por placas de Petri. Eles usaram o meio de Rappaport

modificado (Modified Semisolid Rappaport - MSR) contendo 3,2 g de ágar, 65 mg de verde malaquita oxalato e 17,25 g de $MgCl_2$ por litro. Os nutrientes foram reduzidos para 60% da formulação do Rappaport. Em trabalhos comparativos, o uso deste meio, incubado por 18 horas sob temperatura de 37°C, aumentou em 22,3% a sensibilidade (detecção de amostras positivas) comparada ao método cultural tradicional (DE SMEDT et al., 1986).

Perales e Audicana (1989) avaliaram o efeito da temperatura de incubação na eficiência do meio MSR para a detecção de salmonela a partir de 104 amostras de produtos cárneos. O microrganismo estava presente em 41 amostras, das quais o meio SR (Semi-sólido Rappaport) incubado a 35°C permitiu detectar 90,2%, o BGA (Brilliant Green Agar), 63,4%, o meio SR incubado a 43°C, 58,5% e o BSA (Bismuth Sulfite Agar), 46,3%. O meio SR incubado a 43°C foi 100% específico, seguido pelo SR a 35°C (72,6%), o BSA (36,6%) e o BGA (25,1%). O meio SR incubado a 35°C forneceu a melhor combinação sensibilidade-especificidade. Apesar da incubação do meio SR a 43°C ter aumentado a especificidade do meio de 72,6% para 100%, houve uma perda considerável de sua sensibilidade.

Um meio similar foi proposto por De Smedt et al., (1986) contendo 2,7 g de ágar, 37 mg de verde malaquita oxalato e 23,3 g $MgCl_2$. O conteúdo de nutrientes também foi reduzido. Como uma modificação do RV, o ágar foi chamado MSRV (modified semisolid Rappaport-Vassiliadis). O mais seletivo, MSR, é incubado a 35-37°C, enquanto para o MSVR foi proposto 43°C (reduzido para 42°C, Baird et al., 1989). Como toda a família Rappaport, este meio não contém açúcares.

Esta modificação de De Smedt (De Smedt et al., (1986) tornou o meio mais hipertônico. Foi observado que concentrações mais elevadas de ágar resultavam em zonas de migração muito reduzidas e concentrações menores, apesar de proporcionar uma detecção mais rápida, tornava o meio instável e frágil durante o manuseio das placas de Petri. A concentração de cloreto de magnésio de 2,33% e incubação a 42°C foram suficientes para a inibição de *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter diversus*. A redução da concentração de ágar de 0,29 % para 0,27%

aumentava a zona de migração, bem como o uso de 0,92% de triptose ao invés de tripton, resultava na formação de zonas de migração maiores (BUSSE, M., 1995). Estes fatores, combinados com uma temperatura de incubação de 42°C, permitiram condições adequadas para a multiplicação e conseqüente migração das cepas de salmonela (DE SMEDT et al., 1986). A adição de novobiocina também é inibitória para *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (DE SMEDT et al., 1986; CHAU & HUANG, 1976). Desta forma a eficiência desse meio é decorrente da habilidade de *Salmonella* spp em migrar através do meio altamente seletivo que é conferido pela presença de oxalato de verde malaquita, cloreto de magnésio, novobiocina, temperatura de incubação a 42°C (O'DONOGUE et al., 1992) e pH reduzido, o que minimiza a migração da maioria das Enterobacteriaceae móveis, exceto espécies de *Salmonella* spp.

De Smedt & Bolderdijk (1987) demonstraram que um pequeno número de células (60 UFC/mL) podiam ser recuperadas, mesmo que o número de bactérias competidoras estivessem na ordem de 10^7 . Segundo estes autores, o isolamento pelo método tradicional, utilizando o caldo TBG (Tetrionato Verde Brilhante), depende do número de competidores, enquanto que o isolamento no meio MSR/V independe do alto número de microrganismos competidores.

De Smedt & Bolderdijk (1990), em estudo colaborativo com amostras de cacau em pó e chocolate, encontraram diferença significativa ao comparar o MSR/V versus o RV, mas o efeito foi devido à presença de 3 cepas de 11 que eram de *Salmonella* spp lactose positiva. Quando as cepas lactose positiva foram excluídas da análise estatística não foram observadas diferenças no estudo. Quando cepas imóveis de *Salmonella* spp são esperadas, De Zutter et al., (1991) recomendam que o crescimento nas placas de MSR/V que não apresentarem migração seja semeado em algum outro ágar seletivo.

Amostras contendo microrganismos que não são capazes de migrar a 42°C, mas sim em temperaturas inferiores, podem resultar em falso-positivas devido à temperaturas de incubação menores que 42°C ou prolongada permanência a temperatura ambiente após período de incubação. Deste modo, além do controle

da temperatura da incubadora, é importante a leitura das placas logo após a retirada do meio da estufa incubadora (O'DONOGUE et al., 1992).

A superfície do meio MSR/V é inoculada com 0,1 mL de cultura pré-enriquecida (motilidade em enriquecimento direto) em 3 gotas eqüidistantes após 20 mais ou menos 2 horas de incubação, podendo também ser inoculado a partir de outros caldos seletivos (motilidade em enriquecimento indireto) após 8 mais ou menos 0,5 horas de incubação (BOLDERDJK & MILAS., 1996).

Os métodos de detecção por motilidade são técnicas de cultura mais simples. Os resultados negativos e presuntivamente positivos podem ser obtidos em 48 horas. Ele consiste em promover o pré-enriquecimento das amostras, nas mesmas condições recomendadas pelo método clássico, passando-se em seguida para uma etapa simultânea de enriquecimento seletivo e plaqueamento diferencial em MSR/V. O ágar semi-sólido permite a diferenciação de *Salmonella* spp após 24 horas de incubação a 42°C, em função da ativa motilidade neste meio, em contraposição à incapacidade de migração dos competidores na mesma velocidade (SILVA e EIROA; 1993).

As cepas de salmonela, se presentes na amostra, formam zonas de migração circular na superfície do meio MSR/V atingindo de 10 a 40 mm de raio em 24 horas de incubação a 42°C, enquanto os demais microrganismos (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*) são totalmente inibidos ou, quando se desenvolvem, as zonas circulares de migração não ultrapassam raios de 4 a 6 mm (DE SMEDT et al., 1986). Esta migração é caracterizada por uma zona turva esbranquiçada ao redor da gota de inoculação, que pode se espalhar por toda a extensão da placa. Se o meio permanecer de coloração azul, sem formação de zona turva, o teste é considerado negativo (ausência de *Salmonella* spp móvel). O crescimento de microcolônias em volta da gota não é considerado como migração. O resultado falso-negativo não deve ocorrer com o meio MSR/V porque *Salmonella* spp, ao se mover por quimiotaxia através do meio, forma os halos de migração que facilitam a visualização de seu crescimento, o que não acontece com os competidores (DE SMEDT et al., 1994).

Cepas não produtoras de H₂S também são facilmente detectadas no meio MSR/V, uma vez que a caracterização da presença de *Salmonella* spp neste meio não depende da habilidade da bactéria produzir H₂S. Em combinação com sementeira em BPLS (Agar Verde Brilhante Fenol Lactose Sacarose), a sorologia com cultura pura a partir do BPLS é tão possível quanto a partir do MSR/V (DE SMEDT et al., 1994).

Devido à baixa incidência de sorotipos de salmonela imóveis (<0,1%) e ao percentual de amostras negativas para salmonela (90%), os métodos de detecção baseados na motilidade têm tido reconhecimento na rotina laboratorial, e entre eles o MSR/V, por apresentar um número reduzido de falsos-positivos resultando em rapidez na análise, e, conseqüentemente, redução de custos de armazenamento para a indústria de alimentos em geral (OGGEL et al., 1990).

Em janeiro de 1993, a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) adotou, preliminarmente, o método MSR/V para a detecção de salmonela em amostras de cacau e produtos achocolatados e, em 1995, para *dried milk products* após a realização de estudos comparativos com o método tradicional para estas classes de produtos (BOLDERDIJK & MILAS, 1996).

Estudos comparativos foram efetuados utilizando o método MSR/V frente a outros métodos de detecção de salmonela em amostras de alimentos, como imunoenzimático *Salmonella* - tek, Bactometer, tradicional, (O'DONOGUE et al., 1992), modified 1-2 test e tradicional (OGGEL et al., 1990), tradicional (DE SMEDT & BOLDERDIJK, 1990; DE SMEDT et al., 1991; De ZUTTER et al., 1991; DE SMEDT et al., 1994) não havendo diferença estatística nos resultados.

O teste Tecra^R UniqueTM *Salmonella*, quando comparado ao meio MSR/V por Poppe e Duncan (1996), em carcaças de frango, cortes de frango e carne mecanicamente separada (CMS) de perus, num total de 100 amostras demonstraram diferença estatística significativa a favor do MSR/V, segundo o teste de McNemar ($\chi^2 = 21,04$).

Fierens & Huyghebaert (1996) realizaram um trabalho comparativo entre o método tradicional e cinco diferentes métodos para a pesquisa de *Salmonella* spp

em 217 amostras de rações naturalmente contaminadas. 21 amostras foram positivas para *Salmonella* na combinação dos seis métodos. O método tradicional (usando como enriquecimento seletivo somente o RV) detectou 17 amostras positivas (81%), o MSRV 19 (90,5 %), Salmosyst-Rambach 8 (38,1%), Salmonella-Tek 19 (90,5%) Dynabeads anti-Salmonella 7 (33,33%) e EIA FOSS 21 (100%).

2 LISTERIA MONOCYTOGENES

A bactéria hoje conhecida como *Listeria monocytogenes* foi descrita pela primeira vez no ano de 1926 por Murray e colaboradores como a causa de doenças entre cobaias de laboratório e coelhos, do Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Os autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o “novo organismo” devido a elevação característica nos valores sanguíneos de leucócitos mononucleares. Em 1925, Pirie isolou um organismo muito similar de um gerbil selvagem. Ele o chamou de *Listerella hepatolytica* pelo comprometimento hepático durante a infecção. A similaridade dos organismos descritos pelos diferentes pesquisadores levou, em consenso, ao nome de *Listerella monocytogene*. Subseqüentemente foi modificado para *Listeria*, porque *Listerella* já era a denominação de um grupo de protozoa. É interessante ressaltar que, tanto Murray quanto Pirie, atribuíram as infecções dos animais ao consumo de alimentos contaminados (POST, 1994).

O gênero *Listeria* encontra-se, atualmente, constituído por cinco espécies (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri*), as antigas espécies *L. grayi* e *L. murrayi* foram reclassificadas no novo gênero *Murraya* (*M. grayi* subsp. *grayi*, *M. grayi* subsp. *murrayi*) e a espécie *L. denitrificans* foi reclassificada no novo gênero *Jonesia* (*J. Denitrificans*) (SILVA et al., 2007).

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes regulares Gram-positivos, medindo de 0,4 a 0,5 µm de diâmetro por 5 – 20 µm de comprimento, com terminações arredondadas, ocorrendo aos pares, em cadeias curtas ou isoladamente, não-esporogênicos, catalase positivos e não-produtores de H₂S. Desenvolvem-se em condições de aerobiose e microaerofilia, tendo preferência à ambiente com 10% de dióxido de carbono bem como numa ampla faixa de temperatura (3-45°C), com temperatura ótima entre 30-37°C, sendo consideradas psicrotrófilas, em função da capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração. Apresentam motilidade característica a 20-25°C, com movimentos rotatórios ou de tombamento, devido aos flagelos peritríquicos,

mas são imóveis a 37°C. Fermentam a glicose com produção de ácido láctico, sem produção de gás (SILVA et al., 2007).

L. monocytogenes multiplica-se em pH entre 5,0 e 9,0 com ótimo em pH 7,0 e 7,5. É termolábil, podendo ser destruída durante o cozimento. Temperaturas como as utilizadas para pasteurização de leite a 71,7°C por 15 segundos podem inativar este microrganismo (MÜLLER & WEBER, 1996).

Doyle et al., (1985) observaram a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em alimentos desidratados com aw inferior a 0,93, valor este, até então, considerado mínimo para o desenvolvimento da bactéria, supondo que, pelo menos por um certo período de tempo, *Listeria monocytogenes* seria capaz de tolerar condições de baixa atividade de água. A atividade de água ótima para seu desenvolvimento é próxima a 0,97. Contudo, essa bactéria tem a capacidade de multiplicar-se em atividade de água considerada baixa para a multiplicação de patógenos – 0,92. Já foi relatada a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* a 4°C por, pelo menos, 132 dias em caldo tripticase soja contendo NaCl na concentração de 25,5%, com Aw de aproximadamente 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Listeria monocytogenes apresenta alta tolerância ao sal, podendo multiplicar-se em meios com teores de 10% de NaCl e de sobreviver por um ano em meio com 16% de NaCl quando o pH era mantido em 6,0. Shahamat et al., (1980), apud Loguercio, et al., (2001), relataram a sobrevivência a 37°C por 15 dias em 10,5% de NaCl e de 5 dias em teores de 20 a 30% de NaCl. A bactéria foi capaz de sobreviver mais de 100 dias em teores de 10,5 a 30% de NaCl quando a temperatura era mantida em 4°C.

Doyle (1988) relatou que *Listeria monocytogenes* tolera concentrações de nitrito de sódio de cerca de 156 ppm, valor máximo permitido para carnes curadas nos Estados Unidos. A inibição do crescimento do patógeno, no entanto, é obtida pela combinação de outros fatores como demonstrado por Shahamat et al. (1980), apud Loguercio et al., 2001 que, ao associar 100 ppm de nitrito, 3% de NaCl e pH próximo a 5,5 a uma temperatura de 5°C, observaram inativação da bactéria.

A bactéria *Listeria monocytogenes* está distribuída amplamente no ambiente; ela se encontra em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição. Comum no intestino de humanos e animais domésticos (incluindo moscas), produtos agrícolas frescos, meio ambientes da área de processamento na indústria (TOMPKIN et al., 2001). Têm sido isoladas de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados não só em outros países como também no Brasil (FRANCO e LANDGRAF, 2003). De acordo com Barreto (2001), no Brasil, trabalhos publicados recentemente indicam a presença de *Listeria monocytogenes* em camarões (10% - região sul), filé de peixe (29,1% - região sul), leite pasteurizado e ensacado (16,7% - região nordeste), produtos cárneos refrigerados (10% - região sudeste), e mortadelas (8% - região sudeste).

Listeria é uma bactéria capaz de desenvolver-se lentamente em temperaturas refrigeradas, mas é sensível a alimentos muito ácidos (iogurte e algumas frutas) e ao calor, sendo facilmente destruída pelo cozimento convencional. De fato essa bactéria se encontra em qualquer ambiente frio e úmido. Esta é uma das razões pela qual o deságüe no piso é uma prática incorreta por aumentar o nível de contaminação das superfícies com esta bactéria. Devido ao seu alto poder de difusão, o microrganismo é constantemente reintroduzido ao meio ambiente da área de processamento na indústria. Os esforços excessivos para controlar *Listeria monocytogenes* podem reduzir o nível de contaminação, mas não se pode, com as tecnologias atuais, erradicar *Listeria monocytogenes* da área de processamento na indústria e nem eliminar completamente o potencial de contaminação dos produtos prontos (TOMPKIN et al., 2001).

Segundo Barreto (2001), o maior risco de contaminação com *Listeria monocytogenes* provém da contaminação pós-processamento depois da cocção, quando não observados os cuidados necessários, no que se refere à manipulação de alimentos crus e mal cozidos, como é o caso de leite e produtos lácteos

(queijos brancos), ovos, sorvetes, hortaliças (adubadas com fezes de animais), mariscos, mexilhões, carnes e produtos cárneos (fiambre, salsicha, embutidos de carne de porco) e, ainda, dos próprios manipuladores de alimentos. Os magarefes de matadouros têm sido reportados como portadores assintomáticos.

Devido à sua associação com animais e reconhecida patogenicidade, a detecção de *Listeria monocytogenes* representa interesse à indústria cárnica, já que seus produtos podem eventualmente veicular o microrganismo. Estima-se que, na Europa, a contaminação de carnes por *Listeria monocytogenes* seja da ordem de 6 a 12% para produtos tipo “delicatessen” crus e carnes processadas e mais de 33% para embutidos secos (JENNIFER et al., 1988).

O primeiro surto de listeriose humana veiculada por alimentos data de 1979, nos EUA, quando 20 pacientes internados apresentaram a doença, atribuída ao consumo de saladas de alface, tomate e salsa (HO et al., 1986 apud LOGUERCIO et al., 2001). Outro surto envolvendo 41 pessoas, foi relatado em 1981, no Canadá, estando relacionado ao consumo de salada de repolho, que se encontrava contaminada pelo uso de adubo orgânico contendo esterco de ovinos infectados pela bactéria. Também foi constatado que os repolhos haviam sido mantidos sob refrigeração por tempo prolongado (SCHLECH III, W. F., LAVIGNE, P. M., BORTULCCI, R. A., et al., 1983, apud LOGUERCIO et al., (2001).

A incidência de *Listeria* spp em carnes cruas pode ser considerada elevada. Farber et al., (1989) encontraram 56% de positividade para *Listeria monocytogenes* em 16 amostras de coxa de frango. Franco et al., (1995) encontraram 96% de positividade para *Listeria* spp em 25 amostras de pele de coxa de frango e 64% no músculo em abatedouro no nordeste da Espanha. Entre janeiro de 1992 a dezembro de 1995, um estudo realizado na França e Bélgica, foi encontrado *Listeria monocytogenes* em níveis considerados baixos, entre 1 e 100 UFC/cm² (UYTTENDAELE et al., 1997). Segundo Oyeniyi et al., (1996), as principais causas da contaminação do frango e de seus produtos foram a limpeza e a desinfecção inadequadas na linha de processamento e no ambiente do abate, uma vez que a presença de *Listeria* sp em frangos é quase inevitável em função

da ampla distribuição deste microrganismo na natureza.

Korsak et al., (1998) encontraram na superfície de carcaças suínas 2% de *Listeria monocytogenes* e 22% de *Listeria* spp, e na superfície de carcaça de gado, 10% de *Listeria monocytogenes* e 54% de *Listeria* spp.

Em carne moída de suíno, Inoue et al., (2000), em análise quantitativa pela técnica de Número Mais Provável (NMP), encontraram 28,6% de positividade em amostras com resultado <0,3; 14,3 % de positividade para amostras com resultado entre 0,3 e <1,1; 28,6% de positividade para amostras com resultado entre 1,1 e <10 e 28,6% de resultados positivos com contagens entre 10 e <100 NMP/g.

Comi et al., (1992) encontraram 91,6% de positividade para *Listeria* spp em carne de gado moída, com contagens menores que 100 UFC/g para *Listeria monocytogenes*; 92,6% de positividade em carne suína também com contagens menores que 100 UFC/g de *Listeria monocytogenes*.

Dentre as espécies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica para o homem e, ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que geralmente provocam sintomas gastrintestinais, as principais manifestações clínicas de listeriose são, inicialmente, semelhantes a um resfriado, com febre baixa e mal estar geral, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro. A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 20-30% dos casos diagnosticados e os grupos susceptíveis, considerados grupos de risco, são mulheres grávidas (e seus fetos) crianças, idosas e indivíduos com o sistema imunológico comprometido (SILVA et al., 2007).

2.1. Métodos para Isolamento de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes não era considerada um importante patógeno em alimentos até ocorrer alguns surtos de listeriose no início dos anos 1980; devido ao consumo de alimento contaminado. Conseqüentemente, alguns meios seletivos foram desenvolvidos para o isolamento de *Listeria monocytogenes* em

alimentos. McBride & Girard (1960) apud Vlaemynck et al., (2000) desenvolveram um meio seletivo para o isolamento de *L. monocytogenes* de amostras clínicas, mas foram encontrados problemas com a biota contaminante como *Streptococcus*, *Micrococcus*, Enterobactérias e *Pseudomonas*.

Muitas modificações do meio foram subseqüentemente desenvolvidas como o Modified McBride's Ágar, porém a seletividade era insuficiente. Muitos investigadores buscavam melhorar a seletividade propondo modificações de fórmulas. O desenvolvimento do cloreto de lítio feniletanol moxalactam Ágar LPM por Lee e McClain (1986), apud Vlaemynck et al.,(2000), foi uma significativa melhoria para o isolamento de *Listeria monocytogenes* considerando a resistência geral de *Listeria* sp frente ao cloreto de lítio e cefalosporinas, como moxalactam e ceftazidina. Estes princípios são a base para outros meios seletivos. O caráter indicativo neste meio ainda estava baseado no desenvolvimento de colônias azulado-acinzentadas quando do uso da iluminação de Henry (VLAEMYNCK et al., 2000).

A adição de esculina ao meio resultando na formação de colônias verde acinzentadas puxando para preto e em alguns casos, o meio também modificava sua cor para preto, tornava mais fácil à visualização e identificação das colônias. Estes elementos foram explorados, posteriormente, na maioria dos meios usados para o isolamento de *Listeria* spp, como Agar Oxford (CURTIS et al., 1989), Ágar Oxford modificado (McCLAIN & LEE, 1988) e Ágar Palcam (VAN NETTEN et al., 1989). Porém ainda havia necessidade de um meio que pudesse distinguir *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp não patogênica. Além disso, sabe-se que durante o enriquecimento em caldo seletivo, *Listeria monocytogenes* pode ser inibida pelo rápido crescimento de *Listeria innocua*. O Ágar hemolítico ceftazidina cloreto de lítio – HCLA, “enhanced haemolysis agar” – EHA e algumas modificações deste, *Listeria monocytogenes* Ágar sangue - LMBA, recentemente desenvolvido Rapid L'mono de Foret & Dorey (1997) e o meio ALOA (OTTAVIANI et al.,1997) são exemplos de tais meios que possibilitam a diferenciação de *Listeria monocytogenes* de *Listeria* spp (VLAEMYNCK et al., 2000).

O enriquecimento seletivo, realizado em duas etapas (a primeira em caldo UVM (“University Vermont modified”), e a segunda em caldo Fraser), tem a finalidade de inibir a microbiota acompanhante, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria* spp. O efeito seletivo do caldo UVM é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina, e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico, acriflavina e citrato de ferro. O enegrecimento do meio evidencia a presença de *Listeria* spp. Após 48 horas de incubação, as culturas que não enegrecem, são consideradas negativas (DIFCO & BBL MANUAL, 2003).

Na seleção e isolamento em ágar Palcam, observa-se a não fermentação do manitol e a formação de esculetina pela hidrólise da esculina, reação revelada pela presença de ferro trivalente. Palcam é meio sólido onde se encontram presentes as substâncias sulfato de polimixina B, cloreto de lítio, ceftazidina e cloridrato de acriflavina, com a finalidade da inibição da biota acompanhante. *Listeria monocytogenes* hidrolisa a esculina, dando como resultado a formação de um halo negro ao redor das colônias. Este agente não fermenta o manitol, o que o diferencia de contaminantes como *Enterococcus* e *Staphylococcus*. A incubação em condições microaerófilas inibe o desenvolvimento de aeróbios, como espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* que podem desenvolver-se sobre o meio (DIFCO & BBL MANUAL, 2003).

O meio ALOA, para seleção e isolamento, utiliza o princípio básico dos meios existentes pela adição dos agentes seletivos inclusive cloreto de lítio, ceftazidina e polimixina para reduzir o desenvolvimento de competidores. Esculina é substituída por um substrato cromogênico e um substrato enzimático (lípase) que resulta em um aparecimento de colônia azulada típica para todas as listerias e a capacidade de diferenciar entre *Listeria monocytogenes* de outras *Listerias* sp, pela produção de um halo opaco claro que cerca as colônias. A combinação cromogênica X-glucoside é somada com o substrato para a detecção da β -glucosidase, que é comum para toda a espécie de *Listeria*, resultando em colônias de coloração azul. A diferenciação da *Listeria monocytogenes* da *Listeria*

sp é baseada na produção de fosfatidilinositol-específico fosfolipase C em cepas de *Listeria monocytogenes* que somado a um substrato purificado específico resulta em um halo opaco claro ao redor das colônias de *Listeria monocytogenes* (VLAEMYNCK et al., 2000).

A confirmação bioquímica e diferenciação das espécies são realizadas por meio da verificação da produção de beta-hemólise em Ágar sangue de cobaia (*L. monocytogenes* é positiva), prova de CAMP-test (*Listeria monocytogenes* produz reação de CAMP positiva com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e negativa para *Rhodococcus equi* ATTC 6939), motilidade característica no Ágar motilidade modificado (*Listeria* spp apresenta crescimento móvel característico em forma de guarda-chuva), capacidade de fermentar ramnose e, α - metil D – manosídeo, incapacidade de fermentar xilose e o manitol (Oxoid manual, 1998).

O teste de CAMP é considerado como definitivo para *L. monocytogenes*. Um isolado que é considerado CAMP positivo para *S. aureus* e negativo para *R. equi* deve ser considerado como um isolado positivo para *L. monocytogenes*, mas não necessariamente um isolado virulento (McKELLAR, 1994).

2.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR), baseia-se em duas propriedades de DNA: 1) as cadeias integrantes da dupla hélice do DNA separam-se sob o aumento de temperatura, processo este reversível; 2) a enzima de DNA polimerase é capaz de replicar *in vitro* uma seqüência de DNA, desde que haja uma fita de DNA para servir de molde ou alvo, um pequeno trecho de fita capaz de iniciar o processo (“primer” ou oligonucleotídeos iniciadores complementares ao DNA alvo) e nucleotídeos livres (formadores da molécula de DNA), além de sais e tampões nas concentrações adequadas (MADUREIRA JUNIOR S., 1992 apud PONTES, 1999).

A PCR é baseada na repetição cíclica de três reações: 1) desnaturação; 2) anelamento; 3) extensão, com variações de temperaturas. A técnica difundiu-se

após a identificação da bactéria *Thermus aquaticus thermophilus*, que produz uma polimerase termoestável resistente a altas temperaturas, chamada *Taq* DNA Polimerase. O magnésio é um importante co-fator na PCR, pois a *Taq* DNA Polimerase requer grandes concentrações de magnésio livre para ligar-se à amostra de DNA alvo, além de “primers” e nucleotídeos livres (BICKLEY et al., 1996 apud PONTES, 1999).

Após a separação das fitas duplas de DNA, ocorre hibridização de pequenos oligonucleotídeos iniciadores, os “primers”, com o DNA alvo. A DNA polimerase tem capacidade de, a partir do iniciador, sintetizar uma fita complementar de DNA, adicionando nucleotídeos de forma seqüencial, com base na seqüência do DNA molde. A temperatura inicial do processo é, em média de 94°C, com a qual é possível desnaturar o DNA, isto é, quebrar as pontes de hidrogênio que mantêm as ligações entre as bases da cadeia e liberar cadeias únicas de DNA alvo que não necessitam estarem puras ou em grandes quantidades para serem amplificadas. Ao diminuir-se a temperatura de 94°C para 40°C a 60°C, dá-se a condição para que os pares de iniciadores reconheçam as seqüências complementares do DNA alvo e ligue-se a estes (TAYLOR, 1991 apud PONTES, 1999).

O segmento de DNA amplificado é visualizado sob luz ultravioleta em gel agarose corado com brometo de etídio, revelando produtos que são comparadas com um marcador padrão e que devem corresponder ao tamanho esperado, conforme o par de iniciadores utilizados.

O sistema de detecção de patógenos BAX System[®] é um método de triagem utilizado para alimentos e amostras ambientais, que combina velocidade e facilidade de uso com uma performance capaz de obter resultados exatos. Este sistema utiliza a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a qual cria milhões de cópias do fragmento de DNA alvo, caso esteja presente. Em seguida é possível obter resultados “positivo ou negativo”, diretamente do sistema (Manual do usuário BAX System[®]).

O BAX System[®] fornece detecção qualitativa de seções de DNA que são altamente específicas para *Salmonella* spp em uma grande variedade de alimentos e amostras ambientais. Usa a PCR para amplificar um fragmento específico de DNA de bactérias e usa a detecção fluorescente para analisar o produto da PCR. O BAX System[®] combina “primers”, polimerase e nucleotídeos necessários para a PCR dentro de um único tablete. A especificidade de um ensaio de PCR é determinada pela seqüência de DNA dos “primers” empregados. O produto da reação PCR é automaticamente analisado pela detecção da fluorescência emitida. Cada tablete de PCR contém um corante fluorescente, o qual se liga com a dupla fita de DNA e emite um sinal em resposta à luz emitida (excitação). Durante a fase de detecção automatizada, a temperatura das amostras é lentamente aumentada para desnaturar o DNA, o qual libera o corante causando uma queda na emissão do sinal. A temperatura de desnaturação e a magnitude da mudança do sinal fluorescente são medidas, da qual permite emissão de resultados (AOAC, 2002).

A concentração celular pode ser incrementada mais rapidamente pelo uso de ácido nucléico alternativo, e pelo uso da reação da polimerase em cadeia, a qual amplifica exponencialmente uma seqüência de ácidos nucléicos de até 10^7 vezes em 2-3 horas. A detecção amplificada do produto indica a presença do DNA original e por sua vez, o organismo original (BENNETT et al., 1998).

O BAX System[®] detecta 100% de sorotipos de salmonela em todos os alimentos, incluindo carne bovina, frango, frutas e produtos vegetais, produtos lácteos, chocolates e produtos de panificadora, ração animal e massa após pré-enriquecimento. A realização das análises requer 4 (quatro) passos: enriquecimento da amostra, extração de DNA, amplificação de DNA e leitura de resultados (Manual do usuário BAX System[®]).

Segundo Lou et al., (1997), é necessária a remoção de substâncias inibitórias da PCR em materiais como sangue e fezes (FLUIT et al., 1993), a hemoglobina, a bilirrubina (WIDJOJOAMODJO et al., 1992) e os sais biliares. A purificação do DNA é essencial para a integridade da DNA polimerase (WERNARS et al., 1991).

3. TESTE DE HIPÓTESES SOBRE PROPORÇÕES EM AMOSTRAS DEPENDENTES

Num estudo sobre comparação entre duas proporções populacionais, pode-se definir como significativa uma diferença mínima de 5 pontos percentuais entre elas. A partir desta informação fornecida pelo pesquisador, pode-se, então, definir o número de amostras necessárias a serem ensaiadas de modo que se tenha alta probabilidade de rejeitar a hipótese nula (igualdade das duas proporções) quando a diferença mínima desejada ocorrer. É sabido que, por menor que seja a diferença entre duas proporções, sempre haverá um tamanho de amostra suficientemente grande que permitirá detectar esta diferença. Isto ocorre com o teste de McNemar ao comparar duas proporções em amostras dependentes, e a utilização do Poder do Teste de McNemar, é uma excelente ferramenta para o pesquisador definir a capacidade do teste em detectar diferenças significantes ao problema em estudo quando elas existirem (OGLIARI et al., 2007).

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.M.C., COSTA, F.N., SILVA, M.I.S., SALES, S.S., CORREA, M.R. Toxinfecção Alimentar por *Salmonella Enteritidis*: relato de um surto ocorrido em São Luiz – MA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80, p. 57-58, 2001;

AOAC Research Institute, **Performance Tested MethodSM n° 070202 BAX System[®] with Automated Detection PCR Assay for Screening *L. monocytogenes***, July 24, 2002;

APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3th ed, Amer. Public Health Assoc., Washington, 2002;

BAILEY, J.S., COX, N.A., BLANKENSHIP, L.C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring salmonellae from processed broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 354, 1991;

BAIRD, R.M., CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W., MOSSEL, D.A.A., SKOVGAARD, N. Pharmacopeis of culture Media. Additional Monographs. **International Journal of Food Microbiology**, 9. p. 85-144, 1989;

BANWART, G.J. Glasware apparatus for determining motile bacteria. I. Salmonella. **Poultry Science**, v. 47, p. 1209-1212, 1968.

BARRETTO, E.S.S. **Listeriose**. Disponível no site: <http://smsonline.rio.rj.gov.br/artigos.000627>. Acesso em 18/09/2001;

BARROS, V.R.M., PAVIA, P.C., PANETTA, J.C. *Salmonella* Spp: Sua Transmissão através dos Alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 94, p. 15-19, 2002;

BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437-441, 1998;

BOLDERDIJK, R.F., MILAS, J.E. *Salmonella* detection in Dried Milk products by Motility Enrichment on Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium. Collaborative Study. **J. AOAC Int.** v. 79, p. 441- 450, 1996;

BUSSE, MARTIN. Media for salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 117-131. 1995;

CDC – Center for Disease Control. **Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention**, Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5723md.htm>. Capturado em 18 de junho de 2008 as 11:10 h.

CHAN, S.W., WILSON, S.G., GARCIA, V.M., WHIPPIE, K., OTTAVIANI, A., WHILBY, A., SHAH, A., JOHNSON, A., MAZOLA, M.A., HALBERT, D.N. Comparative study of colorimetric DNA hybridization method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73, p. 419-424. 1990;

CHAU, P.Y., HUANG, C.T. A simple procedure for screening of *Salmonella* using a semisolid enrichment and semisolid indicator medium. **Journal Applied Bacteriology**, v. 41, p. 283-294, 1976;

CHAU, P.Y., HUANG, C.T. A one-day selective migration procedure for detecting salmonellae in faeces. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, p. 405-407, 1974;

COMI, G.R.; CANTONI, F.U.C. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, p. 168 – 171, 1992;

CRAIGIE, J. Studies on serological reactions of flagella of *B. typhosus*. **Journal Immunology**, v. 21. p. 417-511. 1931;

CURIALE, M.S., KLATT, M.J., ROBISON, B.J., BECK, L.T. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening methods for detection of *Salmonella* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 73, p. 43-50, 1990;

CURTIS, G.D.W., MITCHELL, R.G., KING, A.F., GRIFFEN, E.J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 8, p. 95-98, 1989;

DE SMEDT, J.M.; BOLDERDIJK, R. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi solid Rappaport-Vassiliadis medium. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 8, p. 658-661, 1987;

DE SMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R. Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate, and Sugar Confectionery on the use of motility enrichment for *Salmonella* detection in cocoa and chocolate. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 8, p. 659-664, 1990;

DE SMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R., MILAS, J. *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi solid Rappaport-Vassiliadis medium: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 365-373, 1994;

DE SMEDT, J.M. BOLDERDIJK, R.F., RAPPOLD, H., LAUTENSCHLAEGER, D., Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 510-514, 1986;

DE SMEDT, J.M., CHARTON, S., CORDIER, J.L., GRAFF, E., HOEKSTRA, H., LECOUCPEAU, J.P., LINDBLOM, M., MILAS, J., MORGAN, R.M., NOWACKI, R., DONOGHUE, D., VAN GESTEL, G., VARMEDAL, M. Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery on *Salmonella* detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 301-308, 1991;

DE ZUTTER, L., DE SMEDT, J.M., ABRANS, R., BECKERS, H., CATTEAU, M., DE BORCHGRAVE, J., DEBEVERE, J., HOEKSTRA, J., JONKERS, F., LENGES, J., NOTERMANS, S., VAN DAMME, L., VANDERMEERSCH, R., VERBRAEKEN, R., WAES, W. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 11-20, 1991;

DIFCO & BBL **MANUAL**. 1th ed. Becton, Dickinson and Company. Maryland USA. 2003;

DOYLE, M.P. Effects of environmental and processing condition on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42 (4), p. 169-171, 1988;

DOYLE, M.P., MESKE, L.M., MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of non fat dry milk. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 740-742, 1985;

European Food Safety Authority (EFSA). **The EFSA Journal**, 625, p. 1-25, 2008;

FARBER, J.M., SANDERS, G.W., JOHNSTON, M.A. A Survey of various Foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 456-458, 1989;

FIERENS, H., HUYGHEBAERT, A. Screening of *Salmonella* in naturally contaminated feeds with rapid methods **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 301-309, 1996;

FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., NERI, M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp in foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1146-1151, 1983;

FLOWERS, R.S., KLATT, M.J., KEELAN, S.L., Visual immunoassay for detection of *Salmonella* spp in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 973-989, 1988;

FLUIT, A.C., WIDJOJOATMODJO, M.N., BOX, A.T. TORENSMA, R. VERHOEF, J. Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic Immuno-polymerase chain reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1342-1346, 1993;

FORET, J. and DOREY, F. (1997) Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru. **Sciences des Aliments**, v. 17, p. 219-225.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003;

FRANCO, C.M., QUINTO, E.J., FENTE, C., OTERO RODRIGUEZ, J.L., DOMINGUEZ, L., e CEPEDA, A. Determination of principal sources of *Listeria* spp. contamination in poultry meat and poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1320-1325; 1995;

FUNG, F.Y.C., KRAFT, A.A. A rapid and simple method for the detection and isolation of *Salmonella* from mixed cultures and poultry products. **Poultry Science**, v. 49, p. 46-54, 1970;

GARRICK, R.C.; SMITH, A.D. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in applied Microbiology**, v. 18, p. 187-189., 1994;

GOOSSENS, H., WAUTERS, G., DE BOECK, M., JANSSENS, M.E. BUTZLER, J.P. Semisolid selective - motility enrichment medium for isolation of *Salmonellae* from fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 940-941, 1984;

HARPER, J.; SHORTRIGE, F.K. A review. Principles of *Salmonella* isolation. **Journal Applied Bacteriology**, v.46, p. 27-56, 1969;

HOLBROOK, R., ANDERSON, J.M., BAIRD-PARKER, A.C. DODDS, L.M., SAWHNEY, D., STUCHBURY, S.H., SWAINE, D. Rapid detection of *Salmonella* in foods – a convenient two-day procedure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 139-142, 1989;

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods – **Microbiología de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**, vol. 5, p. 606. Editorial Acribia, S.A. 1996;

INOUE, S., NAKAMA, A., ARAI, Y., KOKUBO, Y., MARUYAMA, T., SAITO, A., YOSHIDA, T., TERAOKA, M., YAMAMOTO, S., KUMAGAI, S. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 73 –77, 2000;

International Standard Organization, ISO 16140:2003, **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, 2003**;

International Standard Organization, ISO 6579:2002/amd.1:2007(E);
Microbiology – General guidance for the detection of *Salmonella*, 2007;

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York. International Thomson Publishing, 5th ed., p 507 – 526, 2005;

JENNIFER, L.J., DOYLE, M.P., CASSENS, R.G., SCHOENI, J.L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 497 – 501, 1988;

KALAPOTHAKI, V., VASSILIADIS, P., MAVROMMATI, C.H., TRICHOPOULOS, D. Comparison of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium and tetrathionate brilliant green broth for isolation of *Salmonellae* from meat products. **Journal of Food Protection**, v.46, p. 618-621, 1983;

KORSAK, N., DAAUBE, G., GHAFIR, Y., CHAHED, A., JOLLY, S., VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 535-541, 1998;

LEE, W. H.; McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1215-1217, 1986;

LOGUERCIO, A.P., SILVA, W.P., ALEIXO, J.A.G., COSTA, M.M., VARGAS, A.C. *Listeria monocytogenes*: Um Importante Patógeno de Origem Alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 15, n 80/81, p. 39-48, 2001;

LOU, Q.C., CHONG, S.K., FITZGERALD, J.F. Rapid and Effective Method for preparation of Fecal Specimens for PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Jan, p. 281-283, 1997;

Manual do usuário. **BAX System[®] PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE.: DuPont Qualicon, 2003;

McBRIDE, M.F., GIRARD, K.F. A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. **Journal of laboratory and Clinical Medicine**, v. 55, p. 153-157, 1960;

McCLAIN, D; LEE, W.H. Development of USDA- FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, p. 660-664, 1988;

McKELLAR, R.C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 4219-4225, 1994;

McLAUHLIN, J. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 1997;

MÜLLER, G. WEBER, H. **Mikrobiologie der Lebensmittel**. Behrs`s Verlag, 8 Aufl. p. 562, 1996;

O'DONOGUE, D., MORGAN, R., PUGH, S., DAVDA, C. Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional *Salmonella* detection methods for chocolate, confectionery and biscuit ingredients. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 15, p. 92-95, 1992;

OGGEL, J.J., NUNDY, D.C., RANDALL, C.J. **Modified 1-2 Test system as a rapid screening method for the detection of *Salmonella* in foods and feeds**. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 656-658, 1990;

OGLIARI, P.J., ANDRADE, D.F., PACHECO, J.A., FRANCHIN, P.F., and BATISTA, C.R.V. Statistical methodology for pathogen detection. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1933-1936, 2007;

OYENIYI, B., WEGENER, H. C., JENSEN, N.E., BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 395-401, 1996;

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M. Differential Agar médium for *Listeria monocytogenes*. “**Quimper Froid Symposium proceedings**” P6 A.D.R.L.A. Quimper (F), p. 16-18, 1997;

OXOID **MANUAL**, 8ª Edição. Oxoid Limited. Hampshire, Inglaterra, 1998;

PARDI, M.C., SANTOS, F.I., SOUZA, E.R., PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia, UFG, v. 1, p. 294-308, 1995;

PERALES, I., AUDICANA, A. Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of *Salmonellae* in meat products. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 316-319, 1989;

PONTES, A. **Avaliação da reação da Cadeia pela Polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* sp em amostras ambientais de origem avícola (“swab de arrasto”)**, Dissertação de mestrado – Porto Alegre, 1999;

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

POST, D.E. **Food-borne pathogens** – Monograph number 2. *Listeria*. Technical Support Manager. Oxoid Laboratories Co. p. 25; 1994;

SALLES, M.A.F., SILVA, P.K.S., FONSECA, S., REIS, V., CARNEIRO, A.L., BRANCO, F.R., SILVA, P.L., CUNHA, A.P., Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 92, nº 92/93, p. 3640, 2002;

SIEGEL, S. **Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences**. New York: McGraw Hill, pg. 350, 1956;

SILVA, N., EIROA, M.N.U. Avaliação do meio Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado para detecção rápida de *Salmonella* em alimentos. Coletânea ITAL, Campinas 23(1), p. 68-77, jan/jun.1993;

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.A.C., SILVEIRA, F.A. **Métodos de análises microbiológica de alimentos**. Manual técnico ITAL n. 14, Campinas, p. 135-141. 2007;

STUART, P.F., PIVNICK, H. Isolation of *Salmonellae* by Selective Motility Systems. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 365-372, 1965;

TIEJEN, M., FUNG, D.Y.C. *Salmonellae* and Food Safety. **Crit. Rev. Microbiol.** Cleveland, v. 21, p. 53-83, 1995;

TOMPKIN, R.B., SCOUT, V.N., BERNARD, D.T., SVEUM, W.H., GOMBAS, K.S., Pautas para prevenir la contaminación com *Listeria monocytogenes* después del procesamiento. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 21, p. 381-395, may 2001;

UYTTENDAELE, M.R., NEYTS, K. D., LIPS, R.M. E DEBEVERE, J.M. Incidence of *Listeria monocytogenes* im poultry and poultry products from Belgium and French abbatoirs. **Food Microbiology**, v. 14. p. 339-345, 1997;

VAN NETTEN, P., PERALES, I., VAN DE MOOSDIJK, A., CURTIS, G.D.W., . MOSSEL, D.A.A., Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. **International Journal of Food Microbiology**, n.8, p. 299 – 316, 1989;

VAN SCHOTHORST, M., RENAUD, A.M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). **Journal Applied Bacteriology**, v. 54, p. 209-215,1983;

VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of *Salmonellas*: in overview. **Journal Applied Bacteriology**, v. 54, p. 69-76, 1983;

VASSILIADIS, P., PATERNAKI, E., PAPAICONOMON, N., PAPADAKIS, J.A., TRICHOPOULOS, D. Nouveau procede d'enrichissement de *Salmonella*. Ann. **Microbiol. Inst. Pasteur**, v. 127B, p. 195-200, 1976;

VLAEMYNCK, G., LAFARGE, V., SCOTTER, S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of Aloa, a diagnostic, chromogenic isolation medium. **Journal of Applied microbiology**, v. 88, p. 430-441, 2000;

WERNARS, K., HEUVELMAN, C.J., CHAKRABORTY, T. E NOTERMANS, S.H.W. Use of polimerase chain reaction for the detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 121-126, 1991;

WIDJOJOATMODJO, M.N., FLUIT, A.C., TORESMA, R., VERDONK, G.P.H.T., e VERHOEF, J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of Salmonellae in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3195-3199, Dec, 1992;

XIROUCHAKI, E., VASSILIADIS, P., TRICHOPOULOS & MAVROMMATI, C.H., A note on the performance of Rappaport's medium, compared with Rappaport-Vassiliadis broth, in the isolation of *Salmonellas* from meat products, after pre-enrichment. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, p. 125-127, 1982;

CAPÍTULO 2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 E O BAX SYSTEM[®] (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO E CARNES SUÍNAS, NATURALMENTE CONTAMINADAS.

CAPÍTULO 2 Comparação entre os métodos ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 e o BAX System® (DuPont-Qualicom) na detecção de *Salmonella* sp em amostras de carcaças de frango e carnes suínas, naturalmente contaminadas.

1 INTRODUÇÃO

Este estudo tem como objetivo comparar o desempenho entre os métodos ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 (avaliando-se o MSRV - Ágar Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado da marca Oxoid e da marca Acumedia) e o BAX System® (DuPont-Qualicom), na detecção de *Salmonella* spp em amostras de carcaças de frango e carnes suínas, naturalmente contaminadas, conforme descrito abaixo:

- a) Método ISO 6579 com o BAX System®;
- b) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid) com o BAX System®;
- c) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o BAX System®;
- d) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid)
- e) Método ISO 6579 e o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid);
- f) Método ISO 6579 com o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado – Acumedia).

2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises de *Salmonella* spp foram realizadas utilizando-se, simultaneamente, o método tradicional ISO 6579 (Skovgaard, N. 2002; ISO 6579:2002/amd. 1:2007(E)) e os métodos AOAC 993-07/995-07 (De Smedt et al., 1994, AOAC, 2006) e Bolderdijk & Milas, 1996) (MSRV Oxoid e Acumedia) e BAX System[®], conforme mostrado na Figura 1, página 45.

Para cada partida de meio de cultura, diariamente, foi feito um controle positivo com *Salmonella* Enteritidis.

2.1 Amostras

- a) Um total de 247 amostras de carcaças de frango foi coletado durante o abate, logo após o chuveiro existente no final da operação de depenagem, ou imediatamente após a evisceração, antes do chuveiro de lavagem.
- b) Foi analisado um total de 256 amostras de retalhos de carne suína crua proveniente da desossa da cabeça do suíno recém abatido e recortes de desossa.

Os pontos de coleta das amostras foram selecionados por haver maiores probabilidades de se encontrar amostras positivas para *Salmonella* spp (experiência do autor);

Todas as amostras foram coletadas na linha de processamento de um frigorífico com SIF, localizado em Santa Catarina, Brasil.

Imediatamente após a coleta as amostras foram enviadas ao laboratório e, num intervalo de no máximo 2 horas, foram submetidas à análise de *Salmonella* spp.

2.2 Pré-enriquecimento das amostras para análise de *Salmonella* spp

Pesou-se 25 +/- 0,5g de amostra em saco Whirl-Pak estéril (Nasco) em balança modelo Dilumat 3, (AES Laboratories – França), e adicionou-se 225 mL de água peptonada tamponada (APT) (Oxoid CM: 509).

Homogeneizaram-se as amostras em homogeneizador peristáltico (MA-440 Marconi – Brasil) por 1 minuto e incubou-se à 36°C +/- 1°C por 20 – 24 h.

2.3 Detecção de *Salmonella* spp pelo método da AOAC 993-07/995-07 (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado – Oxoid e Acumedia).

Transferiu-se alíquotas de 0,1 mL da amostra pré-enriquecida para placas contendo o meio seletivo MSRV (Acumedia 7511^A) adicionado de 1 mL/L de solução 2% de novobiocina (INLAB 5701 – Brasil) e para placas contendo o meio MSRV (Oxoid CM 910) adicionado do suplemento SR 161E (Oxoid) conforme recomendação do fabricante. Cada alíquota de 0,1 mL foi depositada em três locais equidistantes em uma mesma placa. As placas inoculadas foram incubadas a 42,0°C +/- 0,5°C por 24 horas. Após incubação observaram-se as placas que apresentavam motilidade positiva (halo de migração visível pela diferença de tonalidade de cor do meio) e procedeu-se como a seguir:

- a) As culturas consideradas presuntivamente positivas (motilidade positiva) foram transferidas, com auxílio de alça de platina, a partir da parte mais externa do crescimento, para placas contendo os meios seletivos: Ágar verde brilhante (VB) (Oxoid CM 329/263), Ágar Hektoen (Oxoid CM419) e/ou Ágar Xilose Lisina Desoxycholato (XLD) (Oxoid CM469). Todos os meios foram incubados por 24h à 37°C. Unidades formadoras de colônias típicas nos meios seletivos foram confirmadas pelas provas bioquímicas, Ágar lisina ferro (LIA), (Merck 1.11640), Ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Merck 1.03915) e caldo uréia (Merck 1.08483), e provas sorológicas - soro polivalente somático, e soros grupo específicos B, C₁, C₂, D, E - (Probac do Brasil). Quando necessário, o sistema API 20E (Biomerux Brasil S/A) foi

usado como complementar na identificação. As cepas consideradas positivas foram enviadas para tipificação no Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Brasil, em tubos de ágar nutriente (Oxoid CM3).

2.4 Detecção de *Salmonella* spp pelo método ISO 6579.

Transferiu-se 0,1 mL da amostra pré-enriquecida para 10 mL de caldo Rappaport–Vassiliadis Soya Peptone -RVS (Oxoid, CM 0866) e 1,0 mL para 10 mL de caldo tetracionato, segundo Muller Kauffmann- MKTT (Muller Kauffmann Tetracionato) (Oxoid, CM 0343, Oxoid manual , 1998) adicionado de 19 mL/L de uma solução de iodo (5 gramas de iodeto de potássio mais 4 gramas de iodo em 20 mL de água destilada); 9,5 mL/L de uma solução de verde brilhante 0,1%; e, 40mg/L de novobiocina. Novobiocina é adicionado para inibir o crescimento de *Proteus* sp. O Caldo RVS foi incubado a 42°C +/-0,5°C por 22 a 24 horas e o caldo MKTT foi incubado a 37°C +/- 0,5°C por 22 a 24 horas. Após incubação, com auxílio de alça de platina de 5 µL, transferiu-se alíquotas das culturas em caldo RVS e MKTT para placas contendo os meios seletivos: Xilose lisina desoxicolato Ágar - XLD (Oxoid, CM 469), Ágar verde Brilhante (Oxoid CM 263) adicionado de 1 mL/0,5 L de solução de novobiocina a 1%, Ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante Ágar - MLCB (Oxoid, CM 783) e Ágar Hektoen - HE (Oxoid, CM 419). Todos esses meios de cultura seletivos foram incubados a 37°C +/- 0,5°C por 24/48 horas. Unidades formadoras de colônias típicas nos meios seletivos foram confirmadas pelas provas bioquímicas e sorológicas conforme descrito no item 2.3

2.5 Detecção de *Salmonella* spp pelo BAX System®.

Amostras pré-enriquecidas foram submetidas à análise por PCR, utilizando o protocolo do fabricante do BAX System® (DuPont Qualicon- Wilmington – DE – USA): Após o enriquecimento da amostra, ligou-se o termociclador/detector e o computador; esperou-se um minuto e iniciou-se a utilização do BAX System® com a digitalização dos dados da amostra conforme instrução do manual do usuário.

Adicionou-se 150 µL de protease para 12 mL de tampão lise e transferiu-se 200 µL do reagente de lise para cada tubo de reação lise. A este tubo de reagente lise adicionou-se 5 µL da amostra pré-enriquecida em caldo APT utilizando ponteiros descartáveis; fecharam-se os tubos e efetuou-se a reação de lise. Para salmonela a reação efetuou-se a 37°C por 20 minutos para ocorrer a lise celular e a digestão de proteínas, e depois 95°C por 10 minutos para inativação da protease. Estas operações foram realizadas em blocos aquecedores para tubos de PCR previamente aquecidos. Os tubos foram então colocados em bloco de resfriamento previamente mantido em geladeira. Os tubos permaneceram neste bloco por cerca de 5 minutos. Pipetou-se então 50 µl de amostra contidas nos tubos de lise para tubos contendo tablete de PCR acondicionados no bloco de resfriamento e fechou-se com tampas óticas com auxílio de ferramenta específica fornecido pelo fabricante. Levou-se o bloco para o termociclador/detector e deu-se início ao programa automatizado. Após amplificação, uma janela se abre e cada poço aparece com uma cor diferente e um símbolo no centro de cada poço. Um sinal de “menos” (-) indica que o teste é negativo para o organismo alvo. Um sinal de “mais” (+) indica que o teste é positivo para o organismo alvo, neste caso *Salmonella* spp. Outro sinal, como interrogação em cor amarela, leva a uma consulta ao fabricante.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi feita conforme o teste não paramétrico de McNemar (SIEGEL, S. 1956), $(|ND - PD| - 1)^2 / (ND + PD) = \chi^2$ ($\chi^2 > 3,84$ é significativo ao nível de $p = 0,05$) e conforme ISO 16140, para amostras naturalmente contaminadas, item 5 – Métodos Qualitativos – Protocolo técnico para suas validações, onde são definidos:

- a) Concordância relativa (RA): Grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas;
- b) Desvio Positivo (PD): O método alternativo se torna um falso positivo

quando mostra um desvio positivo se ele indica um resultado positivo quando o método de referência indica um resultado negativo;

- c) Desvio Negativo (ND): O método alternativo indica um desvio negativo se ele dá um resultado negativo quando o método de referência dá um resultado positivo;
- d) Sensibilidade relativa (RS): Capacidade do método alternativo para detectar o alvo quando ele é detectado pelo método de referência;
- e) Especificidade relativa (RE): Capacidade do método alternativo de não detectar o alvo quando ele não é detectado pelo método de referência.

O cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa para *Salmonella* spp é apresentado na Tabela 1.

Figura 1: Fluxograma para a detecção de *Salmonella* spp pelos métodos ISO 6579, AOAC 993-07/995-07 e BAX System® (DuPont-Qualicom).

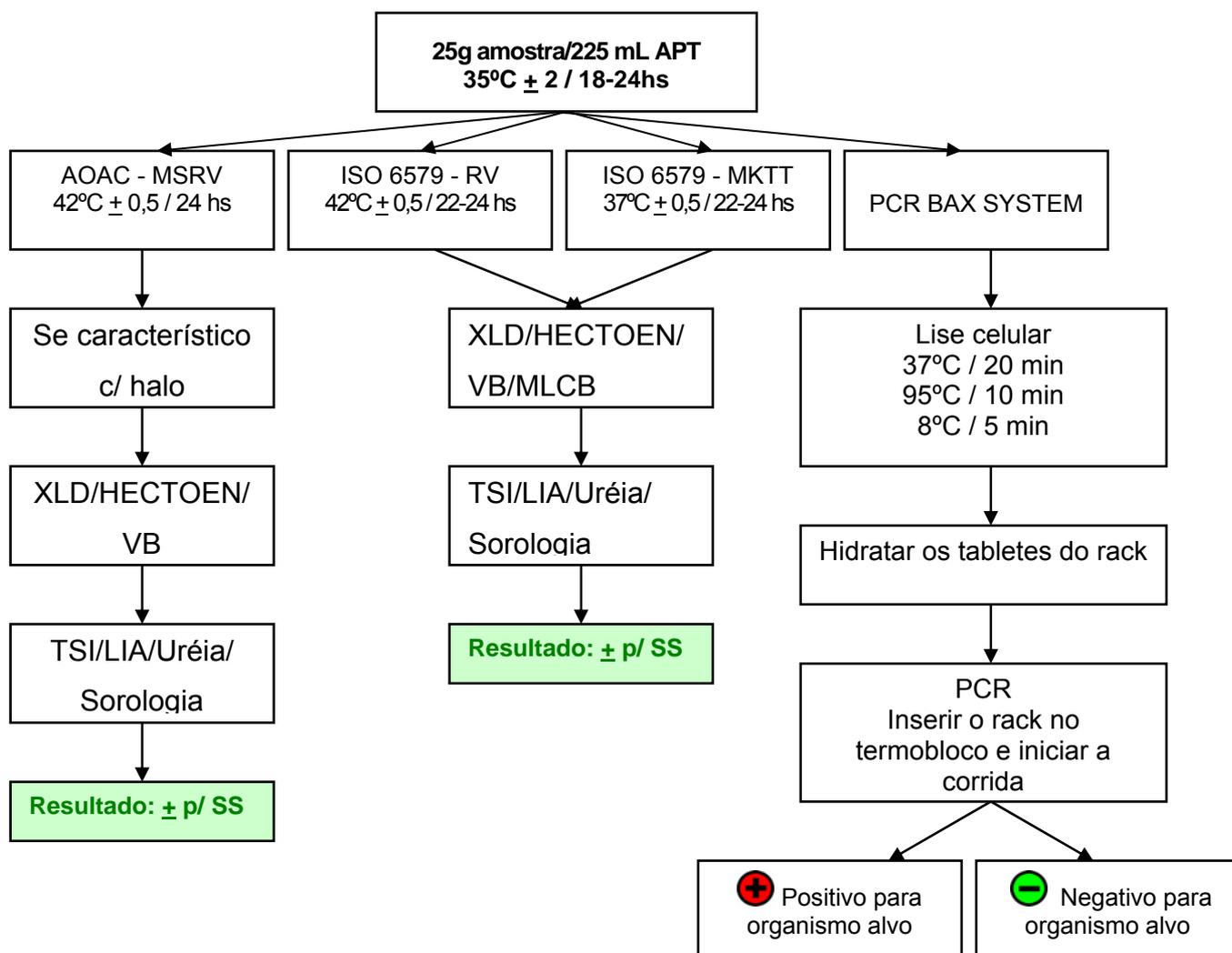


Tabela 1: Cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa na detecção de *Salmonella* spp.

Métodos		PA (++)	NA (--)	ND (+-)	PD (-+)	X ²	Sum	PA + NA	Concordância Relativa RA (%)	N+	Sensibilidade Relativa RS (%)	N-	Especificidade Relativa RE (%)
Referencia	Alternativo						N		100x(PA + NA) N	PA + ND	100x PA N+	NA + PD	100x NA N-
ISO 6579	BAX	70	357	16	60	24,33	503	427	84,89	86	81,40	417	85,61
ISO 6579	AOAC (Acumedia)	73	353	13	64	32,47	503	426	84,69	86	84,88	417	84,65
ISO 6579	AOAC (Oxoid)	55	370	31	47	2,88	503	425	84,49	86	63,95	417	88,73
AOAC (Acumedia)	BAX	115	351	22	15	0,97	503	466	92,64	137	83,94	367	95,90
AOAC (Oxoid)	BAX	86	357	16	44	12,15	503	443	88,07	102	84,31	401	89,02
AOAC (Oxoid)	AOAC (Acumedia)	96	360	6	41	24,60	503	456	90,65	102	94,11	401	89,77

Legenda:

RE - Especificidade Relativa;

RS - Sensibilidade Relativa;

RA - Concordância Relativa;

PA - concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA - concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

PD - Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);

ND - Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);

3 RESULTADOS

Os métodos AOAC 993-07 (MRSV Acumedia e Oxoid), ISO 6579 e BAX System[®] juntos detectaram como positivas para *Salmonella* spp 160 amostras (31,81%).

Dezenove amostras foram detectadas somente por um dos métodos testados acima, sendo: duas (2) com o AOAC (MSRV da Oxoid), cinco (5) com o AOAC (MSRV da Acumedia), seis (6) com o método ISO e seis (6) com o BAX System[®].

Os resultados desse estudo são apresentados na Tabela 2 e na Tabela 3, na página 50.

a) Método ISO 6579 com o BAX System[®]:

O método ISO 6579 detectou 86 amostras positivas versus 130 do BAX System[®], sendo concordantes 70 e 357 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 60 amostras foram positivas para o BAX System[®] e negativas no método ISO 6579 e 16 amostras foram positivas no método ISO 6579 e negativas no BAX System[®]. O $\chi^2 = 24,23$ ($p=0,00001$) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 84,89%, a especificidade relativa foi de 85,61% e a sensibilidade relativa foi de 81,40%. O BAX System[®] apresentou uma taxa de Falso Negativo de 18,60% (100 – Sensibilidade Relativa) e a taxa de Falso Positivo foi de 14,39% (100 – Especificidade Relativa)

b) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid) com o BAX System[®]:

O método AOAC 993-07 (Oxoid) detectou 102 amostras positivas versus 130 do método BAX System[®], sendo concordantes 86 e 357 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 16 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Oxoid) e negativas para o BAX System[®] e 44 amostras foram positivas para o BAX System[®] e negativas no método AOAC 993-

07 (Oxoid). O $\chi^2 = 12,15$ ($p=0,0001$) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 88,07%, a especificidade relativa foi de 89,02% e a sensibilidade relativa foi de 84,31%. O método BAX System[®] apresentou uma taxa de Falso Negativo de 15,69% ($100 - \text{Sensibilidade Relativa}$) e a taxa de Falso Positivo foi de 10,98% ($100 - \text{Especificidade Relativa}$).

c) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o BAX System[®];

O método AOAC 993-07 (Acumedia) detectou 137 amostras positivas versus 130 do método BAX System[®], sendo concordantes 115 e 351 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 22 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Acumedia) e negativas para o BAX System[®] e 15 amostras foram positivas para o BAX System[®] e negativas no método AOAC 993-07 (Acumedia). O $\chi^2 = 0,97$ ($p=0,324$) não demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 92,64%, a especificidade relativa foi de 95,90% e a sensibilidade relativa foi de 83,94%. O método BAX System[®] apresentou uma taxa de Falso Negativo de 16,06% ($100 - \text{Sensibilidade Relativa}$) e a taxa de Falso Positivo foi de 4,10% ($100 - \text{Especificidade Relativa}$)

d) Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia) com o Método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid)

O método AOAC 993-07 (Acumedia) detectou 137 amostras positivas versus 102 do método AOAC 993-07 (Oxoid), sendo concordantes 96 e 360 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 41 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Acumedia) e negativas para o método AOAC 993-07 (Oxoid) e 6 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Oxoid) e negativas no método AOAC 993-07 (Acumedia). O $\chi^2 = 24,60$ ($p=0,00001$) demonstra diferença estatística entre os métodos. A

concordância relativa foi de 90,65%, a especificidade relativa foi de 89,77% e a sensibilidade relativa foi de 94,11%. O método AOAC 993-07 (Oxoid) apresentou uma taxa de Falso Negativo de 5,89% (100 – Sensibilidade Relativa) e a taxa de Falso Positivo foi de 10,23% (100 – Especificidade Relativa).

e) Método ISO 6579 e o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Oxoid);

O método ISO 6579 detectou 86 amostras positivas versus 102 do método AOAC 993-07 (Oxoid), sendo concordantes 55 e 370 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 47 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Oxoid) e negativas no método ISO 6579 e 31 amostras foram positivas no método ISO 6579 e negativas no método AOAC 993-07 (Oxoid). O $\chi^2 = 2,88$ ($p=0,089$) não demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 84,49%, a especificidade relativa foi de 88,73% e a sensibilidade relativa foi de 63,95%. O método AOAC 993-07 (Oxoid) apresentou uma taxa de Falso Negativo de 36,05% (100 – Sensibilidade Relativa) e a taxa de Falso Positivo foi de 11,27% (100 – Especificidade Relativa).

f) Método ISO 6579 com o método da AOAC (MSRV-Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - Acumedia);

O método ISO 6579 detectou 86 amostras positivas versus 137 do método AOAC 993-07 (Acumedia), sendo concordantes 73 e 353 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 64 amostras foram positivas para o método AOAC 993-07 (Acumedia) e negativas no método ISO 6579 e 13 amostras foram positivas no método ISO 6579 e negativas no método AOAC 993-07 (Acumedia). O $\chi^2 = 32,47$ ($p=0,00001$) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 84,69%, a especificidade relativa foi de 84,65% e a sensibilidade relativa foi de 84,88%. O método AOAC 993-07 (Acumedia) apresentou uma taxa de Falso Negativo de 15,12% (100 –

Sensibilidade Relativa) e a taxa de Falso Positivo foi de 15,35% (100 – Especificidade Relativa)

Tabela 2: Detecção de *Salmonella* spp em carcaças de frango e carnes suínas pelas metodologias ISO 6579, AOAC 993-07 (Oxoid) e AOAC 993-07 (Acumedia) e Bax System®.

BAX System®	ISO 6579			AOAC 993-07 Oxoid			AOAC 993-07 Acumedia		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	70	60	130	86	44	130	115	15	130
Negativo	16	357	373	16	357	373	22	351	373
Total	86	417	503	102	401	503	137	366	503
AOAC 993-07 Acumedia									
Positivo	73	64	137	96	41	102	-	-	-
Negativo	13	353	366	6	360	401	-	-	-
Total	86	417	503	137	366	503	-	-	-
AOAC 993-07 Oxoid									
Positivo	55	47	102	-	-	-	-	-	-
Negativo	31	370	401	-	-	-	-	-	-
Total	86	417	503	-	-	-	-	-	-

(-) não se aplica

Tabela 3: Resultados estatísticos da detecção de *Salmonella* spp em amostras de carcaças de frango e carnes suínas pelas metodologias ISO 6579, AOAC 993-07 (Oxoid), AOAC 993-07 (Acumedia) e Bax System®.

Métodos	X²	Valor p	RA	RE	RS	FP	FN
ISO x BAX	24,33	0,0001	84,89	85,61	81,40	14,69	18,6
AOAC 993-07 Acumedia x BAX	0,97	0,324	92,64	95,90	83,94	4,10	16,06
AOAC 993-07 Oxoid x BAX	12,15	0,0001	88,07	89,02	84,31	10,98	15,69
ISO x AOAC 993-07 Acumedia	32,47	0,0001	84,69	84,65	84,88	15,35	15,12
ISO x AOAC 993-07 Oxoid	2,88	0,089	84,49	88,73	63,95	11,27	36,05
AOAC 993-07 Oxoid x Acumedia	24,60	0,0001	90,65	89,77	94,11	10,23	5,89

Legenda:

RE – Especificidade Relativa;
 RS – Sensibilidade Relativa;
 RA – Concordância Relativa;
 FP – Falso Positivo;
 FN – Falso Negativo.

4 DISCUSSÃO

O método AOAC detectou o maior número de amostras positivas para *Salmonella* sp quando comparado ao BAX System[®]. Por outro lado, o método ISO 6579 que é considerado como método oficial para *Salmonella* spp, detectou o menor número de amostras positivas comparado aos outros métodos.

Em comparação com o método ISO, a taxa de isolamento nos métodos AOAC e BAX System[®] para *Salmonella* spp do total de amostras positivas (160) foi de apenas 54%, enquanto o método AOAC isolou 85,6% (Acumedia), 63,8% (Oxoid) e o método BAX System[®] 81,3 %.

Embora tanto o método AOAC 993-07 como o método ISO sejam métodos culturais, o método AOAC permite a identificação de colônias suspeitas de serem salmonela logo no início da análise, a partir da multiplicação de colônias móveis, isoladas no Ágar MSRV. Por outro lado, isso não é possível quando se emprega o método ISO, uma vez que o uso dos caldos seletivos não permite essa seleção prévia.

Outro aspecto a ser levado em consideração quanto ao método AOAC 993-07, é o fato de ser possível detectar salmonela não móvel, pela semeadura de colônias não típicas em ágar MSRV para meios seletivos diferenciais e posterior identificação.

Nesse estudo, o método AOAC 993-07 foi o que mais isolou *Salmonella* spp nas amostras analisadas. Recentemente o método AOAC 993-07 foi considerado como um método ISO Horizontal para alimentos, rações e amostras na produção primária de animais de abate (ISO 6579:2002/Amd.1:2007(E)).

De acordo com Bennett et al., (1998) o BAX System[®] foi sempre positivo quando a concentração de células de salmonela na água peptonada tamponada (APT) foi de 5×10^3 CFU/mL ou maior. De acordo com De Smedt & Bolderdijk (1987), o método AOAC (semi-sólido MSRV) foi sempre positivo quando a concentração celular no APT foi de pelo menos 60 células por mL, independente do alto número de células contaminantes também presentes no caldo. Isto

significa que o método AOAC (semi-sólido MSRV) tem 83 vezes mais capacidade numérica de detecção quando comparado ao BAX System[®]. Este cálculo matemático pode explicar, teoricamente, as amostras negativas obtidas com o BAX System[®], mas não explica os resultados negativos no método AOAC (semi-sólido MSRV). Esse método não detecta células não móveis e isto pode explicar a diferença entre os dois métodos quando o BAX System[®] detectou *Salmonella* spp e o método AOAC não detectou.

Outra explicação para a detecção de amostras positivas pelo BAX System[®] e negativas pelo método AOAC, mas com poucas probabilidades, poderia ser atribuída ao estado fisiológico das células, porque o DNA pode persistir em células mortas e ser amplificado pela PCR (DUPRAY et al., 1997; HERMAN 1997; KLEIN & JUNEJA 1997; MASSO & OLIVA 1997, SHERIDAN et al., 1998), e, portanto, esta técnica não poderia ser usada para diferenciar células viáveis de não viáveis, (McKILLIP et al., 1999), daí a necessidade de confirmação com métodos culturais, onde se obtém células vivas para confirmação.

A probabilidade de existência de células mortas presentes na superfície da pele é indiscutível, pois também existem células vivas que pretendemos multiplicar para o teste de detecção em qualquer dos métodos existentes para *Salmonella* spp. Não se sabe ainda, qual é a proporção de multiplicação de células presentes no animal ou ave ainda viva e, qual proporção padece devido a processos de abate, como durante a escaldagem, por exemplo, e, permanecendo na derme como célula morta, possa ser detectado devido a amplificação de DNA nas técnicas de PCR.

O método AOAC 993-07 (Acumedia) detectou mais amostras *Salmonella* sp positiva do que o método AOAC 993-07 (Oxoid). A diferença encontrada entre os dois fornecedores de MSRV (Oxoid e Acumedia) está no valor de pH de cada meio. O meio fornecido pela Oxoid possui um pH de 5,2 +/- 0,2 e o fornecido pela Acumedia possui pH de 5,4 +/-0,2. O pH menor do meio Oxoid, por ser mais seletivo, poderia explicar a menor taxa de recuperação de salmonelas nas amostras analisadas, comparadas ao meio da Acumedia.

De acordo com o Manual do fabricante do BAX System[®], as vantagens deste método combinam velocidade e facilidade de manuseio. Além disso, o método também proporciona resultados em 30 +/- 1h. Esta diminuição reduz, potencialmente, o problema de contaminação cruzada. Não requer interpretação de um especialista, e permite processar até 96 amostras em uma única vez. Esta prática é de alta valia para uso rotineiro de laboratório.

Para o método AOAC 993-07, a confirmação não é tão dependente da experiência do operador. Isto se deve ao fato da leitura de motilidade ser simples e visualmente sem evidência de dúvidas. A possibilidade de positividade é decorrente da migração das células, que elimina praticamente toda a microbiota acompanhante, produzindo colônias mais puras. O repique é realizado em Ágar seletivo-diferencial a partir da área de migração mais externa destas colônias e, conseqüentemente, quando se multiplicam nos mesmos são facilmente diferenciadas e geralmente puras e típicas. Este fato é usado por vários autores (DE SMEDT et al., 1986) e pelo método oficial da AOAC 993.07 (AOAC, 2006) para realizar o ensaio sorológico das culturas que apresentam migração diretamente do meio MSR/V por considerá-las puras (MASSO & OLIVA, 1997).

Em contra partida, quando usamos o BAX System[®], não é possível identificar a cepa em estudos epidemiológicos, exceto quando as culturas são obtidas do pré-enriquecimento ou enriquecimento seletivo para o isolamento de colônias, as quais foram positivas. Um procedimento somente possível a partir de meios culturais.

Após enriquecimento, o Ágar MSR/V, apesar da facilidade de uso, requer 24 horas de incubação e a confirmação de amostras presuntivamente positivas ou definitivamente negativas. Amostras presuntivamente positiva podem ser confirmado por testes sorológicos diretamente da placa de MSR/V e, também pelo isolamento de colônias pela semeadura da área mais externa do halo de migração em meios seletivos diferenciais como Agar XLD, BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar), HE ou outros meios a escolha do analista. Colônias isoladas após 24 horas podem ser usadas para confirmação por testes

bioquímicos adicionais para confirmação definitiva e, inclusive, também por testes genéticos. As cepas confirmadas podem ser usadas para estudos epidemiológicos após definição do sorotipo.

O método AOAC (MSRV) permite a diferenciação de *Salmonella* sp após 24h de incubação a 42°C, baseado na ativa motilidade destes microrganismos no meio, em contraste com a inabilidade dos competidores para migrar com a mesma velocidade. As zonas de migração de *Salmonella* sp podem alcançar raios de 10 a 40 mm. Nos casos de zonas de migração iguais ou superiores a 10 mm, a presença de *Salmonella* sp pode ser esperada (DE SMEDT et al., 1986; SILVA & EIROA, 1993).

O interesse da indústria de alimentos é encontrar e usar um método que detecte o maior índice possível de amostras positivas com o objetivo de encontrar a melhor resposta aos procedimentos de prevenção e monitoramento do programa de redução de patógenos adotado pela companhia e com isso reduzir a frequência deste patógeno. Mais especificamente, o objetivo é estar seguro que o novo método a ser utilizado é capaz de detectar maior número de amostras positivas que o método anteriormente em uso na rotina de seu laboratório. A possibilidade de maior frequência no isolamento de *Salmonella* spp em amostras naturalmente contaminadas pode ser atribuída a maior eficácia do novo método e não poderá ser atribuída a possíveis falhas nos programas de qualidade (Redução de Patógenos) adotados pela companhia.

A combinação de pelo menos dois métodos analíticos aqui comparados e com maior rendimento na detecção de amostras positivas (AOAC-MSRV e BAX System[®]) tem a vantagem de obtenção de resultado positivo ou negativo em 30 horas (BAX System[®]). O microrganismo deverá ser isolado pelo método cultural (AOAC-MSRV), que poderá ser utilizado para fins epidemiológicos e ainda, a critério do laboratório, eliminar a possibilidade de falso positivo gerado pelo PCR (BAX System[®]) devido a possibilidade, mesmo que com pouca probabilidade, da amplificação de DNA de células mortas de *Salmonella* spp presentes na amostra, como consequência de processos industriais. Isto requer sim, um especialista

com conhecimento de processos industriais, microbiologia de alimentos e métodos analíticos empregados para análise de amostras.

Os resultados deste estudo são concordantes com outros que, da mesma forma, confirmaram a boa produtividade do MSR/V na detecção de *Salmonella* sp em carcaças de frango e carnes cruas (AFFLU & GYLES 1997; MASSO & OLIVA 1997; POPPE & DUNCAN 1996; SCHALCH & EISGRUBER 1997).

5 CONCLUSÕES

Resultados desse estudo demonstram que o método AOAC 993-07, com uso de meio MSR/V (Acumedia) com pH 5,4 e o BAX System[®], não diferiram significativamente para as amostras analisadas. O método por PCR – BAX System[®] - pode ser considerado como método *screening*, e deve ter seus resultados positivos confirmados por um método cultural, neste caso o MSR/V. O método AOAC 993-07 é mais eficiente quanto ao número absoluto de amostras positivas encontradas; deveria ser, portanto, considerado como método de rotina, e também pelo menos, como mais um método oficial para amostras de carnes vermelhas e de aves, em detrimento do método ISO 6579, considerado hoje como método padrão.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFLU, L., GYLES, C.L. A comparison of procedure involving Single Step Salmonella, 1-2 test, and Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis médium for detection of *Salmonella* in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 241-244, 1997;

AOAC Official Method 993.07/995.07. Motility Enrichment on Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18th Edition, 2005, Current Through Revision 1, 2006;

BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.437-441, 1998;

DE SMEDT, J.M.; BOLDERDIJK, R. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi solid Rappaport-Vassiliadis médium. **Journal of Food Protection**, v. 50, p. 658-661, 1987;

DE SMEDT, J.M. BOLDERDIJK, R.F., RAPPOLD, H., LAUTENSCHLAEGER, D., Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 510-514, 1986;

DE SMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R., MILAS, J. *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi solid Rappaport-Vassiliadis médium: Collaborative study. **J. AOAC Int.**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 365-373, 1994;

DUPRAY, E., CAPRAIS, M.P., DERRIEN, A., FACH, P. *Salmonella* DNA persistence in natural sweaters using PCR analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 507-510, 1997;

HERMAN, L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. **Food Microbiology**, v. 14, p. 103-110, 1997;

International Standard Organization, ISO 16140:2003, **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, 2003;**

International Standard Organization, ISO 6579:2002/amd.1:2007(E);
Microbiology – General guidance for the detection of *Salmonella*, 2007;

KLEIN, P.G. JUNEJA, V.K. Sensitive detection of viable detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4441-4448, 1997;

Manual do usuário. **BAX System[®] PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE.: DuPont Qualicon, 2003;

MASSO, R., OLIVA, J. The technical evaluation of an automated analyzer for detection of *Salmonella enterica* in fresh meat products. **Food Control**, v 8, p. 99-103, 1997;

McKILLIP, J.L., JAYCKUS, L.A., DRAKE, M. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skin milk. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 839-844, 1999;

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

SCHALCH, B., EISGRUBER, H. Nachweis von Salmonellen mittels MSR-V-medium: Ein einfaches, schnelles und kostensparendes Kultivierungsverfahren. **Fleischwirtschaft**, v. 77 p. 334-347, 1997;

SHERIDAN, G.E.C., MASTERS, C.I., SHALCROSS, J.A., MACKEY, B.M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1313-1318, 1998;

SIEGEL, S. **Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences**. New York: McGraw Hill, pg. 350, 1956;

SILVA, N., EIROA, M.N.U. Avaliação do meio Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado para detecção rápida de *Salmonella* em alimentos. **Colet. ITAL**, Campinas 23(1), p. 68-77, jan/jun.1993;

CAPÍTULO 3 Comparação do sistema BAX[®] com o método MSRV para detecção de *Salmonella* sp em carcaça de frango e carnes suínas.

“Comparison of the BAX System[®] with the MSRV method for the detection of *Salmonella* in chicken carcasses and pork meat”.

COMPARISON OF THE BAX® SYSTEM WITH AN IN-HOUSE MSR/V METHOD FOR THE DETECTION OF SALMONELLA IN CHICKEN CARCASSES AND PORK MEAT

Paulo R. Franchin^{1,3}; Paulo J. Ogliari^{1,2}; Dalton F. Andrade²; Maura Chiapinoto³; Giovana Lemos³; Marina Rebelatto³; Ivair G. da Silva³; Cleide R.V. Batista^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Brasil;
²Department of Informatics and Statistics, Federal University of Santa Catarina, Brasil; ³Center of Technology Perdigão S/A, Laboratory of Microbiology

Submitted: September 12, 2005; Returned to authors for corrections: February 13, 2006; Approved: September 17, 2006

ABSTRACT

A study was performed to compare the analytical procedure of the BAX® System for *Salmonella* PCR assay with the Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) method, for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated chicken carcass samples (n = 762) and raw pork meat (n = 566). The chicken carcasses samples were collected during slaughtering after defeathering or immediately after evisceration and the raw pork meat collected from the deboned head of recently slaughtered pigs and others deboned raw fresh pork meat. The BAX® System detected 134 *Salmonella*-positive samples in chicken carcasses and 145 samples in pork meat, while the MSRV method isolated 142 and 144 *Salmonella*-positive samples, respectively. No significant difference was observed between the two methods for chicken carcasses and pork meat, according to McNemar test at the 5% level.

Key words: BAX® System, MSRV method, *Salmonella*, chicken, pork meat

INTRODUCTION

Various members of the genus *Salmonella* can cause food intoxication. Foods are commonly tested for the presence of *Salmonella* due to the low infective dose potential of the microorganism (3).

The isolation and identification of *Salmonella* became a problem to meat industry laboratories because of the long time necessary to obtain results with conventional culture methods, such as the ISO 6579 reference method (2) which involves nonselective pre-enrichment, followed by selective enrichment in broth and plating onto differential agar. Suspicious colonies are then confirmed biochemical and serologically. This method can be applied to any type of food and requires 4 to 5 days for the confirmation of the presence of *Salmonella* in a sample (15).

To guarantee microbiological safety during food processing, methods that rapidly detect *Salmonella* are necessary for the

opportune identification of the source of contamination (13). For the food industry that retains its products until the results are obtained, the time-consuming nature of conventional methods cause economic losses, with a consequent continuous interest in alternative, faster methods (42).

Various methods for the detection or isolation of *Salmonella* have been proposed, including immunological methods (7,8,18,19,36,43,45), DNA-DNA hybridization (5,17,24), DNA amplification (21,26,27,37), conductance (34) and impedance measurements (20). In addition, motility-based immunodiffusion tests (modified 1-2 test (35,44) and detection methods based on motility on liquid or semisolid media (6,12,15,23,39) have been used.

The method using modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) agar as selective and differential enrichment medium for *Salmonella* can be stood out because of its simplicity, rapid response and serological confirmation of migrated cultures is

*Corresponding Author. Mailing address: Universidade Federal de Santa Catarina - Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi Florianópolis, SC. CEP 88034-001. Tel.: (48) 3331-5380. E-mail: cbatista@mbox1.ufsc.br

Franchin, P.R. *et al.*

obtained 48 h after the beginning of pre-enrichment (10,11) and low cost (32,33). The method has been validated by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) for cocoa products (AOAC 993-07) (9), for dried milk products (AOAC 995-07) (4) and recently in the Netherlands by the Animal Health Service in monitoring programs for the eradication of *Salmonella* at all levels of poultry meat production (14).

More modern molecular techniques for the detection and characterization of microorganisms involve the use of the polymerase chain reaction (PCR). The BAX[®] system (DuPont Qualicon) for screening *Salmonella* in foods is one of the first commercial PCR-based systems for the detection of pathogens, which simplifies the PCR procedure by combining all necessary reagents (primers, enzyme, deoxyribonucleosides) in a single tablet. The BAX[®] *Salmonella* test is an automated method that uses PCR technology for the detection of *Salmonella* in foods and has AOAC Research Institute (RI) approval status for *Salmonella* detection in meat, milk, and poultry classes of foods (31).

With the technological advances in the detection methods, food industry laboratories are increasingly confronted with the task to validate the analytical procedures for pathogen detection, sometimes already tested and validated for international organisms, such as International Organization for Standardization (ISO), AOAC, British Standards Institute (BSI).

Based on the above considerations, the objective of the present study was to compare two analytical methods for the detection of *Salmonella* sp in chicken carcass and pork meat samples naturally contaminated collected in the same commercial processing plant. The procedures compared were the BAX[®] System, which is based on PCR, and the MSR/V culture method, which is based on phenotypic characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The following samples were studied: a) chicken carcasses collected during slaughtering after defeathering or immediately after evisceration (n = 762), and b) raw pork meat obtained from the deboned head of recently slaughtered pigs (n = 566). Immediately after collection, the samples were sent to the laboratory for analysis within a maximum interval of 2 h between collection and sample preparation for microbiological analysis.

Assay procedure

Twenty-five grams (± 0.5 g) of the sample was weighed in a sterile Whirl-Pak (Nasco) bag on a Dilumate 3 scale (AES Laboratories, France), 225 \pm 0.5 g buffered peptone water (BPW; Oxoid CM: 509) was added, and the mixture was homogenized in a peristaltic homogenizer (MA-440 Marconi, Brazil) for 1 min. The samples were incubated at 36 \pm 1°C for 20-24 h for pre-enrichment. Next, 0.1 ml of the pre-enriched

broth was transferred to a plate at three equidistant locations containing selective MSR/V medium (Acumedia 7511) supplemented with 1 ml of 2% novobiocin (Inlab 5701, Brazil) solution per liter of previously prepared medium according to manufacturer recommendations.

The plates were incubated at 42 \pm 0.5°C for 24 h and growth was interpreted as follows: plates showing positive motility (migration halo visible based on the difference in the color tone of the medium) were considered to be presumptive positive and submitted to serological test with somatic polyvalent serum (Probac do Brasil). The positive plates that showing positive motility, were transferred from migration edge of growth with a platinum loop onto Brilliant Green Agar, Hektoen Enteric Agar and/or Xylose Lysine Desoxycholate medium (Oxoid CM: 329, 419 and 469, respectively), and incubated for 24 h at 37°C. Typical colonies were also confirmed based on biochemical tests, initially Triplice Sugar Iron Agar (TSI) (Merck 1.03915) and Urea broth (Merck 1.08483), and serological tests (somatic polyvalent serum and specific serogroups, mainly B, C₁, C₂, D, E (Probac do Brasil). The API 20E system (Biomérieux Brasil S/A) was used as a complementary test during initial identification. Strains considered to be positive were sent to the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil, in nutrient agar tubes (Oxoid CM3). Plates showing no motility were considered to be negative for *Salmonella* spp.

Aliquots derived from the same pre-enriched broth were submitted to PCR analysis using the BAX[®] system protocol (DuPont Qualicon).

Statistical analysis

The methods were compared statistically using the McNemar test: $[|(a - b) - 1|]^2/a + b = \chi^2$, where *a* corresponds to samples testing positive by the MSR/V method and negative by the BAX[®] system and *b* to samples testing negative by the MSR/V method and positive by the BAX[®] system ($\chi^2 > 3.84$ is significant at a level of $p = 0.05$) (41). The Kappa index, which indicates the strength of the relationship between the row and column variables of a cross tabulation, in tables 1, 2 and 3, was calculated as described by Sachs, L., 1984 (38). Kappa values of < 0.01 indicate no concordance, those between 0.1 and 0.4 indicate weak concordance, those between 0.41 and 0.60 indicate clear concordance, those between 0.61 and 0.80 indicate strong concordance, and those between 0.81 and 1.00 indicate nearly complete concordance.

RESULTS

Salmonella sp was detected in 20.7% of the 762 chicken carcass samples and in 28.3% of the 566 pork meat samples, based on the BAX[®] and the MSR/V positive data.

In chicken carcass samples, the MSR/V method isolated 142 *Salmonella*-positive samples, while the BAX[®] system detected

134, (Table 1) with no significant difference between the two detection procedures (McNemar test, $\chi^2 = 1.23$, $p = 0.2684$)

In pork meat the MSRV method isolated 144 *Salmonella*-positive samples versus 145 detected by the BAX® system (Table 1), with the difference being no significant (McNemar test, $\chi^2 = 0.0000$, $p = 1.0000$).

Considering all samples analyzed, the MSRV method isolated 286 *Salmonella*-positive samples versus 279 detected by the BAX system (Table 1), with no significant difference between the two detection procedures (McNemar, $\chi^2 = 0.507$, $p = 0.4764$).

The Kappa values 0.823, 0.8559 and 0.840 (Table 1), indicate nearly complete concordance between the MSRV and BAX® system methods in both samples analyzed.

Chicken carcasses and pork meat samples show similar specificity by both methods (MSRV and BAX® system). Chicken carcasses samples showed greater sensitivity in MSRV than to the BAX® system and the pork meat samples showed similar sensitivity by both methods (Table 2).

The concordance for chicken carcasses and pork meat samples was 95.0% (Table 2).

All isolates as positive *Salmonella* culture were sent to the Oswaldo Cruz Institute and were confirmed to belong to the genus *Salmonella*.

Cultures positive for *Salmonella* sp isolated by the MSRV method (39 samples) that tested negative in the BAX® system (Table 1) were submitted to analysis by the BAX® system itself

and were confirmed to be positive by the principle of detection of the BAX® system, i.e., PCR.

DISCUSSION

According to Bennett *et al.* (3), the BAX® system was always positive when the cell concentration of *Salmonella* in BPW was 5×10^3 CFU/ml or higher and in the MSRV method, according to Smedt and Bolderdijk (11) motility enrichment was always successful when the *Salmonella* cell concentration was at least 60 per ml, irrespective of the high numbers of competitive cells., i.e., 83 times lower quantity than in the BAX system.

This mathematical calculation might theoretically explain the *Salmonella*-negative samples obtained with the BAX® system, but not explain the negative results by MSRV. The MSRV method does not detect non-motile *Salmonella* and this might explain the difference between the two methods.

Another explain to the positive samples by BAX® system and negative by MSRV method, but with a very low probability, is that samples that tested positive with the BAX® system and negative by the MSRV method might be attributed to the physiological state of the cells, because DNA can be quite persistent in dead cells and may be amplified by PCR (16,22,25,28,40), and therefore this technique could not be used to differentiate viable from nonviable food-borne pathogens (30).

Table 1. Results for *Salmonella* sp in naturally contaminated chicken carcasses and pork meat determined with the BAX system and MSRV method.

Sample	Bax			MSRV					Kappaindex	
	P	N	Total	P	PA	PD	N	ND		NA
Chicken	134	628	762	142	118	24	620	16	604	0,823
Pork Meat	145	421	566	144	129	15	422	16	406	0,856
Both	279	1.049	1.328	286	247	39	1.042	32	1.010	0,840

P: samples positive for *Salmonella*; N: samples negative for *Salmonella*; PA: samples positive for *Salmonella* in MSRV and BAX (MSRV+ BAX+); PD: samples positive for *Salmonella* in MSRV and negative in BAX (MSRV+ BAX-); ND: samples negative for *Salmonella* in MSRV and positive in BAX (MSRV- BAX+); NA: samples negative for *Salmonella* in MSRV and BAX (MSRV- BAX-).

Table 2. Concordance, sensitivity, specificity, false positive rate and false negative rate for *Salmonella* sp in naturally contaminated chicken carcasses and pork meat determined with the BAX system and MSRV method.

Sample	Total Samples	BAX Samples(+)	MSRV Samples (+)	Sensitivity (%)		FN (%)		Specificity (%)		FP (%)		Concordance (%)
				MSRV	BAX	MSRV	BAX	MSRV	BAX	MSRV	BAX	
Chicken	762	134	142	88	83	12	17	96	97	4	3	95
Pork Meat	566	145	144	89	90	11	10	96	96	4	4	95
Both	1.328	279	286	89	86	11	14	96	97	4	3	95

FN: False negative rate is $100 - \text{sensitivity rate}$; FP: False positive rate is $100 - \text{specificity rate}$.

Franchin, P.R. *et al.*

According to the manual of the manufacturer, the advantages of the BAX[®] system combine speed with easy and simple handling. In addition, the method yields results in 30 ± 1 h, reduces the potential of errors such as cross-contamination, does not require interpretation by a specialist, and permits effective processing of a large number of samples with up to 96 tests in a single step, thus being highly valuable for routine laboratory use (Manual of the BAX[®] system).

In contrast, when we used the BAX[®] system, it is not possible to identify strains in epidemiological trials, except when cultures are obtained from pre-enrichment or selective enrichment broth for the isolation of colonies from these positive samples, a procedure that is performed using traditional culture media.

After the pre enrichment the MSR/V method is also simple to use but requires 24h for the incubation time and the confirmation of presumably positive or definitely negative samples. Presumably positive samples can be confirmed by serological tests directly from the MSR/V plate, and also isolated by streaking from the external migration zone from MSR/V onto differential and selective *Salmonella* media such as XLD or BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar). Colonies isolated after 24 h of incubation can be used for any other biochemical test for definitive confirmation whether or not the isolate belongs to the genus *Salmonella*. Strains can then be submitted to typing.

The MSR/V method permits the differentiation of *Salmonella* after 24 h of incubation at 42°C based on the active motility of these microorganisms on this medium, in contrast to the inability of competitors to migrate at the same velocity; migration zones of *Salmonella* strains can reach a radius of 10 to 40 mm. In the case of development of migration zones equal to or larger than 10 mm, the presence of *Salmonella* can be expected (12,42).

The main interest of the food industry is to find a method that detects the highest possible percentage of positive samples in order to obtain the best response in terms of the efficacy of prevention methods and pathogen monitoring adopted by the company (in the present case *Salmonella* sp), i.e., actions aimed at reducing the frequency of this pathogen. Clearly, the objective is to be sure that the new method is able to detect more pathogens than the method already used in daily laboratory routine. A possible higher frequency of isolation of *Salmonella* sp from naturally contaminated samples would be due to the greater efficacy of the new detection method and could not be attributed to possible failures in the quality programs adopted by the company, for example a pathogen reduction program.

The combination of the two analytical techniques reported here has the advantage that, when the two methods are run together in parallel, a positive or negative result can be obtained within 30 h by the BAX[®] system. In addition, the microorganism can be isolated from the MSR/V plate for strain typing for epidemiological purposes permitting here, at the discretion of the laboratory, the elimination of a possible false-positive result

generated by the BAX[®] system due to the very low possibility of the amplification of DNA from dead cells present in samples as a consequence of industrial processing.

In view of the equivalence of the two methods demonstrated by the statistical test, one or the other can be used for the analysis of *Salmonella* sp in these types of samples, taking into account the cost of the method and the urgency of the need to obtain the results for lot release.

The results of this study agree with another that likewise confirms the good productivity of MSR/V agar in chicken carcasses and raw meat samples (1,28,36,39).

MSR/V confirmations is not so dependent on operator experience because plates obtained presented much less accompanying flora, if any at all. This fact is used by several authors (De Smedt *et al.*, 1986) and in the AOAC Official Method 993.07 (AOAC, 1995) to attempt direct serological testing of migrated MSR/V cultures, considering them nearly pure cultures (28).

In this study the productivity for naturally contaminated chicken carcasses and pork meat was 89.93% for MSR/V and 87.73% for BAX[®] system.

These results demonstrate that the MSR/V culture method and the BAX[®] system do not differ significantly from one another for the samples analyzed and the MSR/V methods is as efficient as the BAX[®] system method in detecting *Salmonella* in raw pork meat and chicken carcasses and could be considered as a routine screening method for motile *Salmonella* in these samples.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the company Perdigão S/A for logistic support, for the use of their microbiology installations at the Center of Technology, Research and Development, and for the resources (equipment and material) necessary for this study of comparison of the in-house analytical procedures, as well as the entire technical staff of the laboratory and the Federal University of Santa Catarina.

RESUMO

Comparação do Sistema BAX[®] com o Método MSR/V para detecção de *Salmonella* em carcaças de frango e carnes suínas

Um estudo foi realizado com o objetivo de comparar o procedimento analítico de detecção de *Salmonella* com o Sistema BAX[®] automatizado, baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o método de Rappaport-Vassiliadis em Agar Semi-Sólido modificado (MSR/V) para detecção de *Salmonella* em amostras de carcaças de frango naturalmente contaminadas (n=762) e retalhos de carne suína (n=566). O Sistema BAX[®] detectou 134 amostras positivas para *Salmonella*

em carcaças de frango e 145 amostras positivas para *Salmonella* em retalhos de carne suína, enquanto o MSRV detectou 142 e 144 amostras positivas respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos, segundo McNemar ao nível de significância de 5%.

Palavras chave: Sistema BAX®, Método MSRV, *Salmonella*, frango, carne suína

REFERENCES

- Afflu, L.; Gyles, C.L. A comparison of procedure involving Single Step Salmonella, 1-2 test, and Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for detection of *Salmonella* in ground beef. *Inter. J. Food Microbiol.*, 37: 241-244, 1997.
- Anonymous. Microbiology - General guidance for the detection of *Salmonella*. International Standard Organization, ISO 6579, 1987.
- Bennett, A.R.; Greenwood, D.; Tennant, C.; Banks, J.G.; Betts, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26:437-441, 1998.
- Boldejik, R.F.; Milas, J.E. *Salmonella* detection in Dried Milk products by Motility Enrichment on Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium. Collaborative Study. *J. AOAC Int.*, vol. 79, 441-450, 1996.
- Chan, S.W.; Wilson, S.G.; Vera-Garcia, M.; Whippie, K.; Ottaviani, M.; Whilby, A.; Shah, A.; Johnson, A.; Mozola, M.A.; Halbert, D.N. Comparative study of colorimetric DNA hybridization method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 419-424, 1990.
- Chau, P.Y.; Huang C.T. A simple procedure for screening of *Salmonella* using a semisolid enrichment and semisolid indicator medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 41: 283-294, 1976.
- Curiale, M.S.; Klatt, M.J.; Robison, B.J.; Beck L.T. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening methods for detection of *Salmonella* in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 43-50, 1990.
- D'Aoust, J.Y.; Sewell, A.M.; Greco P. Commercial latex agglutination kits for the detection of food borne *Salmonella*. *J. Food Protect.*, 54: 725-730, 1991.
- De Smedt, J.; Bolderdijk, R.; Milas, J. *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77: 365-373, 1994.
- De Smedt, J.M.; Bolderdijk, R.F. Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate, and Sugar Confectionery on the use of motility enrichment for *Salmonella* Detection in cocoa and chocolate. *J. Food Prot.*, 53: 659-664, 1990.
- De Smedt, J.M.; Bolderdijk, R.F. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food Prot.*, 50: 658-661, 1997.
- De Smedt, J.M.; Bolderdijk, R.F.; Rappold, H.; Lautenschlaeger D. Rapid *Salmonella* detection on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. *J. Food Prot.*, 49: 510-514, 1986.
- De Smedt, J.M.; Chartron, S.; Cordier, J.L.; Graff, E.; Hoekstra, H.; Lecoupeau, J.P.; Lindblom, M.; Milas, J.; Morgan, R.M.; Nowacki, R.; Donoghue, D.; Van Gestel, G.; Varmedal, M. Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery on *Salmonella* Detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 13: 301-308, 1991.
- De Vries, T.S. *Salmonella* control in the Netherlands - leading to reduction. *World Poultry.*, 19: 26-28, 2003.
- De Zutter, L.; De Smedt, J.M.; Abrams, R.; Beckers, H.; Catteau, M.; Borchgrave, J.; Debevere, J.; Hoekstra, J.; Jonkers, F.; Lenges, J.; Notermans, S.; Van Damme, L.; Vandermeersch, R.; Verbracken, R.; Waes, G. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *Inter. J. Food Microbiol.*, 13: 11-20, 1991.
- Dupray, E.; Caprais, M.P.; Derrien, A.; Fach, P. *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 507-510, 1997.
- Fitts, R.; Diamond, M.; Hamilton, C.; Neri, M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 1146-1151, 1983.
- Flowers, R.S.; Klatt, M.J. Immunodiffusion screening method for detection of motile *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72: 303-311, 1989.
- Flowers, R.S.; Klatt, M.J.; Keelan, S.L. Visual immunoassay for detection of *Salmonella* spp in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 973-989, 1988.
- Gibson, A.M. Use of impedance measurements to estimate numbers of antibiotic resistant *Salmonella* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 6: 89-92, 1988.
- Hanes, D.E.; Koch, W.H.; Miliotis, M.D.; Lampel, K.A. DNA probe for detecting *Salmonella enteritidis* in food. *Mol. Cell. Probes.*, 9: 9-18, 1995.
- Herman, L. Detection of viable and Dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiol.*, 14: 103-110, 1997.
- Holbrook, R.; Anderson, J.M.; Baird-Parker, A.C.; Dodds, L.M.; Sawhney, D.; Stuchbury, S.H.; Swaine, D. Rapid detection of *Salmonella* in foods - a convenient two-day procedure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 139-142, 1989.
- Izat, A.L.; Driggers, C.D.; Colberg, M.A.; Adams, M.H. Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* on poultry carcasses and processing waters. *J. Food Prot.*, 52: 564-570, 1989.
- Klein, P.G.; Juneja, V.K. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4441-4448, 1997.
- Kongmuang, U.; Luk, J.M.C.; Lindberg, A.A. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 3072-3074, 1994.
- Mahon, J.; Lax, A.J. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the *spvR* gene. *Epidemiol. Infect.*, 111: 455-464, 1993.
- Masso, R.; Oliva, J. The technical evaluation of an automated analyzer for the detection of *Salmonella enterica* in fresh meat products. *Food Control.*, 8: 99-103, 1997.
- McKillip, J.L.; Jaykus, L.; Drake, M. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4264-4268, 1998.
- McKillip, J.L.; Jaykus, L.A.; Drake, M. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J. Food Prot.*, 62: 839-844, 1999.
- Mrozinski, P.M.; Betts, R.P.; Coates, S. Performance tested method certification of BAX for screening *Salmonella*: a case study. *J. AOAC Int.*, 81: 1147-1154, 1998.
- O' Donoghue, D.; Winn, E. Comparison of the method with an in-house conventional method for detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods. *Let. Appl. Microbiol.*, 17: 174-177, 1993.
- O'Donoghue, D.; Morgan, R.; Pugh, S.; Davda, C. Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional *Salmonella* detection methods for chocolate, confectionery and biscuit ingredients. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 92-95, 1992.

Franchin, P.R. *et al.*

34. Ogden, I.D.; Cann, D.C. A modified conductance medium for the detection of *Salmonella* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 459-464, 1987.
35. Oggel, J.J.; Nundy, D.C.; Randall, C.J. Modified 1-2 test system as a rapid screening method for the detection of *Salmonella* in foods and feeds. *J. Food Protect.*, 53: 656-658, 1990.
36. Poppe, C.; Duncan, C.L. Comparison of Detection of *Salmonella* By the Tecra Unique *Salmonella* test and the modified Rappaport Vassiliadis medium. *Food Microbiol.*, 13: 75-81, 1996.
37. Rahn, K.; De Grandis, S.A.; Clarke, R.C.; McEwen, S.A.; Galan, J.E.; Ginocchio, C.; Curtiss III, R.; Gyles, C.L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.*, 6: 271-279, 1992.
38. Sachs, L. Applied statistics: a handbook of techniques. Springer, Heidelberg, Germany, 1984.
39. Schalch, B.; Eisgruber, H. Nachweis von Salmonellen mittels MSRV-medium: Ein einfaches, schnelles und kostensparendes Kultivierungsverfahren. *Fleischwirtschaft.*, 77: 334-347, 1997.
40. Sheridan, G.E.C.; Masters, C.I.; Shalcross, J.A.; Mackey, B.M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1313-1318, 1998.
41. Siegel, S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences, McGraw-Hill Book, Co. New York, NY, 1956.
42. Silva, N.; Eiroa, M.N.U. Avaliação do meio Semi-Sólido de Rappaport-Vassiliadis Modificado para detecção rápida de *Salmonella* em alimentos. *Colet. ITAL, Campinas*, 23: 68-77, 1993.
43. Swaminathan, B.; Aleixo, J.A.; Minnich, S.A. Enzyme immunoassays for *Salmonella*: one-day testing is now a reality. *Food Technol.*, 39: 83-89, 1985.
44. Warburton, D.W.; Oggel, J.; Bowen, B.; Crawford, C.; Durzi, S.; Gibson, E.; Foster, R.; Fox, C.; Gour, L.; Krohn, G.; McDonah, S.; Mackenzie, J.; Todd, E.C.D.; Shaw, S.; Tiwari, N.P.; Trottier, Y.; Wheeler, B.D. A comparison study of the modified 1-2 test and the HPB standard method in the isolation of *Salmonella*. *Food Microbiol.*, 11: 253-263, 1994.
45. Wyatt, G.M.; Langley, M.N.; Lee, H.A.; Morgan, M.R.A. Further studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1383-1390, 1993.

**CAPÍTULO 4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA PARA
DETECÇÃO DE PATÓGENOS.**

**“STATISTICAL METHODOLOGY FOR PATHOGEN
DETECTION”**

Research Note

Statistical Methodology for Pathogen Detection

PAULO JOSÉ OGLIARI,^{1*} DALTON FRANCISCO DE ANDRADE,¹ JULIANO ANDERSON PACHECO,²
 PAULO ROGÉRIO FRANCHIN,³ AND CLEIDE ROSANA VIEIRA BATISTA³

¹Department of Informatics and Statistics, Federal University of Santa Catarina, Postal Office 476, Technology Center, 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ²Centro de Informática e Automação Industrial (CTAI-SENAI), 88032-005, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; and

³Department of Science and Technology of Food, Federal University of Santa Catarina, 12227-010, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

MS 06-463: Received 28 August 2006/Accepted 3 March 2007

ABSTRACT

The main goal of the present study was to discuss the application of the McNemar test to the comparison of proportions in dependent samples. Data were analyzed from studies conducted to verify the suitability of replacing a conventional method with a new one for identifying the presence of *Salmonella*. It is shown that, in most situations, the McNemar test does not provide all the elements required by the microbiologist to make a final decision and that appropriate functions of the proportions need to be considered. Sample sizes suitable to guarantee a test with a high power in the detection of significant differences regarding the problem studied are obtained by simulation. Examples of functions that are of great value to the microbiologist are presented.

Statistical inference related to hypothesis testing and estimation has been widely used by microbiologists in different areas. Despite its wide application, the proper use and perfect understanding of this area of statistics are not always observed in published articles.

In many investigations, there is no concern about defining a priori what a meaningful difference would be regarding the problem in their area of knowledge (3, 4). For example, in a study to compare two proportions, a minimum difference of 5 percent points can be defined as meaningful to the study. On the basis of this information provided by the microbiologist, it is then possible to define the number of observations necessary (sample size) to guarantee a high probability of rejection of the null hypothesis (equality of the two proportions) when the established minimal difference really occurs. It is known that, regardless of how small the difference between two proportions is, there is always a sample size suitable to detect this difference. In other words, rejection of a false null hypothesis is just a matter of increasing the sample size. In particular, this is the case of the McNemar test (1, 3, 8), which was developed to compare two proportions in dependent samples. Therefore, the microbiologist must start a study by defining the minimum difference between parameters that he or she wishes to detect.

On the other hand, in many situations, the microbiologist knows that, for instance, two proportions are different from each other and, in fact, what he or she needs to estimate accurately is the size of the difference, i.e., the problem is much more of estimation than of hypothesis testing.

For example, in a comparison of two methods (conventional and new) used to detect the presence of *Salmonella* based on the comparison of proportions, to know that the presence of *Salmonella*, as indicated by the two methods, is different from one another does not guarantee that one method is better than the other. It is possible that either method provides satisfactory results for the microbiologist. Therefore, sometimes complementary analyses are necessary. The estimation of adequate functions, such as the ratio between the proportions of the presence of *Salmonella* indicated by the new method and by the conventional one, would be more appropriate. Thus, in terms of statistical considerations, the replacement of the conventional method by the new one would be recommended if this ratio is greater than a certain amount stated by the microbiologist. The main goals of the present study were to discuss the application of the McNemar test to the comparison of proportions in dependent samples and the estimation of appropriate functions of these proportions.

MATERIALS AND METHODS

McNemar test. The objective of the McNemar test is to compare two unknown proportions in dependent samples, and it has been widely used by many microbiologists to compare different microbiological methods (2–7, 9, 10). For example, suppose a study is conducted to test whether two methods (conventional and a new one) have the same capacity to indicate the presence of *Salmonella* in contaminated chicken-derived products. The same sample of the product is submitted to the two methods; the null hypothesis (H_0) is that the proportions of positive results are the same in the two methods, and the alternative hypothesis (H_1) is that the proportions of positive results are not the same. In terms of the parameters involved in this type of problem, we have that

* Author for correspondence. Tel: +55 48-3721-7545; Fax: +55 48-3721-9770; E-mail: ogliari@inf.ufsc.br.

TABLE 1. Number (proportions) of the presence of *Salmonella* indicated by the two methods in 200 samples of contaminated chicken-derived products

Conventional method	New methods		Total
	Positive	Negative	
Positive	17 (0.085)	24 (0.120)	41 (0.205)
Negative	39 (0.195)	120 (0.600)	159 (0.795)
Total	56 (0.280)	144 (0.720)	200

$$H_0: \pi_{++} + \pi_{+-} = \pi_{++} + \pi_{+-} \Rightarrow \pi_{+-} = \pi_{+-} \text{ versus}$$

$$H_1: \pi_{++} + \pi_{+-} \neq \pi_{++} + \pi_{+-} \Leftrightarrow \pi_{+-} \neq \pi_{+-}$$

where π_{++} is the true proportion of positive results indicated by the two methods simultaneously; π_{+-} is the true proportion of positive results indicated by the conventional method and negative results by the new method, and π_{-+} is the true proportion of negative results indicated by the conventional method and positive results by the new method. The true proportion of negative results indicated simultaneously by the two methods is represented by π_{--} . In Table 1, we have the data of one of such example, where the two methods were applied in a sample of 200 contaminated chicken-derived products.

The above hypotheses are tested by the McNemar test, which is given by the following equation:

$$\chi^2 = \frac{(n_{+-} - n_{-+} - 1)^2}{n_{+-} + n_{-+}} \quad (1)$$

where n_{+-} and n_{-+} are the quantities of samples in which the presence of *Salmonella* was indicated by only one of the methods. The null hypothesis is rejected, at a significant level α , when χ^2 is greater than the critical value of the χ^2 distribution with 1 df.

The power of the McNemar test and sample size. Generally, the main concern in the application of hypothesis testing is the control of type I errors, i.e., rejection of the null hypothesis when it is true, while type II errors, i.e., acceptance of the null hypothesis when it is false, are neglected. In our example, the type I error would be to say that the proportions of the presence of *Salmonella* indicated by the two methods are not the same, when they are. The type II error would be to say that the proportions of the presence of *Salmonella* indicated by the two methods are the same, when they are not. The probabilities of these two types of errors are represented by α and β , respectively.

As mentioned earlier, in practice, microbiologists should not limit their concern to the rejection or not of the null hypothesis but should also consider the capacity of the test to detect existing differences that are meaningful to the problem studied. This capacity is referred to as the power of the test, which corresponds to the probability of correctly rejecting the null hypothesis when it is false, and is represented by $1 - \beta$. In our example, it would be the capacity of the McNemar test to say that the proportions of positive results indicated by the two methods are different when they are, at least by a certain amount specified by the microbiologist. In practice, for a given α , the researcher should plan the experiment with a sample of a size sufficient to guarantee a test with high power.

To determine the appropriate sample size to detect a minimum difference, δ , between the two proportions π_{+-} and π_{-+} , the microbiologist has to specify the values of α , the desired power, the expected proportion of disagreement, which corresponds to $\eta = \pi_{+-} + \pi_{-+}$, and δ . For instance, when the microbiologist specifies $\alpha = 0.05$, a power of 0.80 (80%), $\eta = 0.30$ as the expected proportion of disagreement, and $\delta = 0.05$, he or she is going to determine the amount of samples of contaminated chicken-derived products that should be submitted to the two methods, in order to guarantee a probability of 0.05 (5%) of saying that the two methods are different, when they are not, and a probability of 0.80 (80%) of saying that the two methods are different, when they are, at least by a difference of 0.05 (5 percent points) between π_{+-} and π_{-+} . In practice, it is usual to state the values of 0.05 for α and 0.80 for the power. The value of δ depends on the problem being studied. Results from a simulation study will be shown in the next section.

Functions of proportions. After the rejection of the null hypothesis by the McNemar test with a high power to detect the desired minimum difference between the proportions of disagreement, the microbiologist would need to estimate the real amount of this difference. Another important point would be the estimation of the proportion of positive results indicated only with the conventional method (π_{+-}). This proportion should be small; otherwise, the new method would not have shown the desired performance. These quantities and others, which depend on the subject of the study, can be expressed as functions of the proportions. Examples of such functions would be as follows:

(i) $F_1(\pi) = \pi_{+-}/\pi_{+-}$, which measures how much the proportion of positive results indicated only with the new method is greater than the proportion of positive results obtained only with the conventional method;

(ii) $F_2(\pi) = \pi_{+-} - \pi_{+-}$, which measures the difference in percent points between the proportion of positive results obtained only with the new method and the proportion of positive results indicated only with the conventional method;

(iii) $F_3(\pi) = \pi_{+-}/(\pi_{++} + \pi_{+-} + \pi_{-+})$, which measures the proportion of positive results obtained with the conventional method only, among all the positive results. The microbiologist wishes this value to be small.

Estimation and confidence intervals for these types of functions can be done via the weighted least-squares or maximum likelihood methods. Details are shown in (1, 8).

RESULTS AND DISCUSSION

In this section, we analyze the data presented in Table 1, in terms of the methodology discussed above. In this example, we have that in 12.0% ($n_{+-} = 24$ of 200) of the samples, the conventional method indicated *Salmonella*, while the new method did not. The opposite happened in 19.5% ($n_{-+} = 39$ of 200) of the samples. The value for the McNemar test is $\chi^2 = 3.11$, which is less than 3.84, the value of the χ^2 distribution with 1 df, indicating that the null hypothesis should not be rejected.

In Figures 1 through 3, we present the results of a simulation study carried out to show the relationship among the power, the sample size (n), the proportion of disagreement (η), and the minimum difference in the McNemar test. All the calculations were done with the software Statistica, at the significance level of 0.05. Figure 1 shows that, to detect a minimum difference of 0.05 with a power of 0.80,

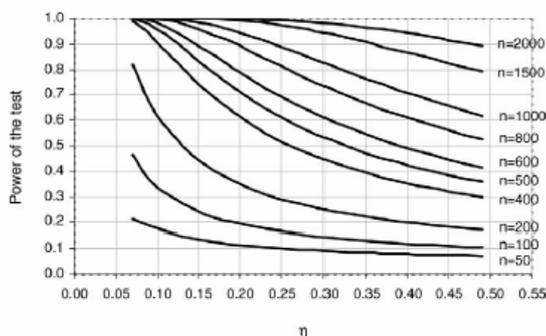


FIGURE 1. Power of the test to detect a minimum difference of 0.05.

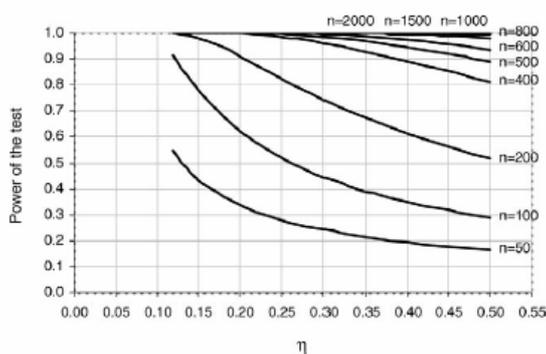


FIGURE 2. Power of the test to detect a minimum difference of 0.10.

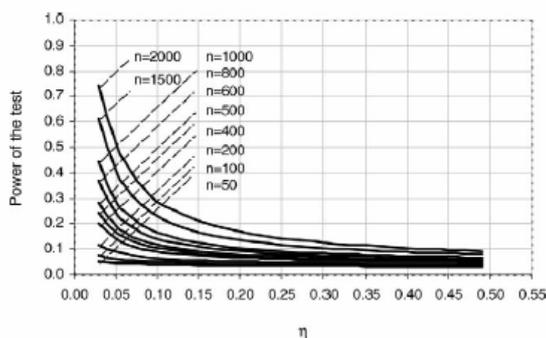


FIGURE 3. Power of the test to detect a minimum difference of 0.01.

a sample size of between 800 and 1,000 is required when a proportion of disagreement of about 0.30 is expected. For situations in which the microbiologist knows only that the proportion of disagreement is no greater than 0.50, he or she should consider a sample size of 1,500 to guarantee a power of 0.80. Figures 2 and 3 present results for the situations in which the microbiologist wants to detect minimum differences of 0.10 and 0.01, respectively.

From Figures 1 through 3, we can see that with 200 samples of chicken-derived products and an expected pro-

portion of disagreement of about 0.30 (63 of 200), the McNemar test has a power of 0.80 to detect only differences greater than 0.10 between the proportions. In other words, if we apply the McNemar test and do not reject the null hypotheses, then what we can conclude is that the two methods do not differ from each other in more than 0.10 or 10 percent points, in terms of the proportions of disagreement, π_{+-} and π_{-+} . This is the case for the data of our example.

To show how the McNemar test depends on the sample size, let's assume that the proportions shown in Table 1 have been obtained from 1,000 samples of contaminated chicken-derived products. In this situation, the McNemar test would provide a value of $\chi^2_1 = 17.38$, knowing that $n_{+-} = 120$ and $n_{-+} = 195$, now indicating a highly significant difference between the two methods at the 5% level of significance, although the sampling proportions are the same as for 200 samples. Going through Figures 1 through 3 with $n = 1,000$, we can conclude that the existing difference detected by the test should be greater than 5 percent points. What we can learn from this is that, if the two methods differ from each other by more than 5 percent points, the microbiologist will be able to detect it in studies that involve at least 1,000 samples.

The McNemar test gives to the microbiologist the information whether the proportions of disagreements are different or not, but it does not provide to the microbiologist the information about the real value of these amounts or functions of them. For instance, on the basis of 1,000 samples, the estimate for the ratio $F_1(\pi) = \pi_{+-}/\pi_{-+}$ is $0.195/0.120 = 1.63$ with a corresponding 95% confidence interval of [1.26, 1.99]. From the confidence interval, we can conclude that, among all the samples with the presence of *Salmonella* indicated with only one of the two methods, the new method indicates a proportion between 26 and 99%, greater than the conventional method. This suggests that the new method works better than the conventional one. On the other hand, the estimate for the ratio $F_3(\pi) = \pi_{+-}/(\pi_{++} + \pi_{+-} + \pi_{-+})$ is $0.120/(0.085 + 0.195 + 0.120) = 0.30$ with a corresponding 95% confidence interval of [0.255, 0.345]. From the confidence interval, we can conclude that, among all the samples with the presence of *Salmonella* indicated with the two methods, the new method did not indicate the presence of *Salmonella* in a proportion between 25.5 and 34.5% of these samples. This result suggests that the new method is not as good as it looked like, when compared with the conventional one.

In the present study, we showed that the McNemar test is sensitive to sample size and that rejection of the null hypothesis associated with this test does not guarantee that one method will be effectively better than the other in practical terms. We also demonstrated the importance of the microbiologist in the definition of the problem to be studied. In many situations, estimation of appropriate functions is much more important for the microbiologist than hypothesis testing. For proportions in dependent samples, tests with a high power and confidence intervals more informative for these functions require a sample size of at least 1,500 observations.

Estimates and confidence intervals for functions of the proportions can be obtained from many statistical programs. Some of them are free and are available on Web sites, e.g., <http://www.graphpad.com/quickcalcs/> and <http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics.html>. A computer program based on Microsoft Excel, developed for the three functions discussed above, can be obtained from the first author.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the reviewers and the editor for their very helpful suggestions, which very much improved this article.

REFERENCES

1. Agresti, A. 2002. *Categorical data analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
2. Champagne, M. J., A. Rabel, and D. Daignault. 2005. A comparison of sample weight and culture methods for the detection of *Salmonella* in pig feces. *J. Food Prot.* 68:1073–1076.
3. De Smedt, J. M., and R. Bolterdijk. 1990. Collaborative study of the international office of cocoa, chocolate and sugar confectionery on the use of motility enrichment for *Salmonella* detection in cocoa and chocolate. *J. Food Prot.* 53:659–664.
4. De Smedt, J. M., S. Chartron, J. L. Cordier, E. Graff, H. Hoekstra, J. P. Lecoupeau, M. Lindblom, J. Milas, R. M. Morgan, R. Nowacki, D. O'Donoghue, G. Van Gestel, and M. Varmedal. 1991. Collaborative study of the international office of cocoa, chocolate and sugar confectionery on *Salmonella* detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 13:301–308.
5. De Zutter, L., J. M. De Smedt, R. Abrams, H. Beckers, M. Catteau, J. De Borchgrave, J. Debevere, J. Hoekstra, F. Jonkers, J. Lenges, S. Notermans, L. Van Damme, R. Vandermeersch, and G. Waes. 1991. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 13:11–20.
6. Flores, M. L., J. H. S. Silva, V. P. Nascimento, L. R. Santos, A. Pontes, C. T. P. Salle, and R. F. F. Lopes. 2001. Detecção de *Salmonella* sp. em ovos de galinhas através da reação em cadeia da polimerase—PCR. *Rev. Hig. Aliment.* 15:63–68.
7. O'Donoghue, D., R. Morgan, S. Pugh, and C. Davda. 1992. Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional *Salmonella* detection methods for chocolate, confectionery and biscuit ingredients. *Lett. Appl. Microbiol.* 15:92–95.
8. Paulino, C. D., and J. M. Singer. 2006. *Análise de dados categorizados*. Editora Edgard Blüches, São Paulo, Brazil.
9. Poppe, C., and C. I. Duncan. 1996. Comparison of detection of *Salmonella* by the TECRA® UNIQUE® *Salmonella* test and T-HE modified Rappaport-Vassiliadis medium. *Food Microbiol.* 13:75–81.
10. Silbernagel, K., R. Jechorek, and C. Carver. 2003. Evaluation of the BAX system for detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* 86:1149–1159.

CAPÍTULO 5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 MODIFICADO, USDA/FSIS MODIFICADO E O BAX SYSTEM® (DUPONT-QUALICOM) NA DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS NATURALMENTE CONTAMINADAS

CAPÍTULO 5 Comparação entre os métodos ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 modificado, USDA/FSIS modificado e o BAX System[®] (DuPont-Qualicom) na detecção de *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos naturalmente contaminadas

1 INTRODUÇÃO

Esse estudo tem como objetivo comparar o desempenho entre os métodos ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 modificado (substituição do Caldo Fraser por Caldo MOPS-BLEB), USDA/FSIS modificado (substituição do Ágar Oxford por Ágar ALOA) e o BAX System[®] (DuPont-Qualicom); na detecção de *Listeria monocytogenes* em salsichas, bacon fatiado, carcaças de frango e cortes de carne suína naturalmente contaminada, conforme descrito abaixo:

Método ISO 11290-1/A1 com o BAX System[®]

Método ISO 11290-1/A1 modificado com o BAX System[®];

Método USDA/FSIS modificado com o BAX System[®]

Método USDA/FSIS modificado com o método ISO 11290-1/A1.

Método USDA/FSIS modificado com o método ISO 11290-1/A1 modificado.

Método ISO 11290-1/A1 com o método ISO 11290-1/A1 modificado

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Nesse estudo foram analisados um total de 334 amostras constituídas de salsichas resfriadas (89), bacon fatiado (116), carnes suínas cruas (52) e carcaça de frango resfriado (77). As amostras foram coletadas na linha de processamento em uma Indústria com SIF localizada no estado de Santa Catarina.

Amostras de carnes suínas cruas e frango resfriado foram analisadas com o objetivo de avaliar amostras naturalmente contaminadas que apresentassem uma carga microbiana maior e mais diversificada do que aquela presente em salsichas e bacon fatiado, conforme experiência prévia do autor.

As amostras foram analisadas, simultaneamente, pela combinação dos métodos ISO 11290-1/A1 (SKOVGAARD, 2002, ISO 11290-1/A1, 2004) ISO 11290-1/A1 modificado, USDA/FSIS (COOK, 1999) modificado e o método PCR BAX System®.

Nesse estudo também se avaliou o uso do plaqueamento direto a partir do caldo de pré-enriquecimento, bem como a combinação de isolados positivos com a leitura de esculina no caldo Fraser. Avaliou-se, também, o uso de diferentes meios de cultura para pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, como caldo Demi-Fraser, caldo UVM (University of Vermont medium), caldo Fraser, caldo MOPS-BLEB (3-(Morpholino) propanesulfonic acid - Listeria enrichment Broth), com plaqueamento sempre em Ágar ALOA.

2.2 Método ISO 11290-1/A1

Um total de 70 gramas de amostra foi homogeneizado em 140 g de solução fisiológica em homogeneizador peristáltico por 2 minutos, e deixada decantar por +/- 3 minutos. Após decantação da amostra por +/- 3 minutos, um total de 30 mL de amostra foi transferido para 70 mL de caldo Demi Fraser concentrado 1,285 vezes, e incubado por 24/26 horas a 30°C. Após o pré-enriquecimento, do caldo

Demi Fraser, transferiu-se 0,1 mL para caldo Fraser (Oxoid CM 895) adicionado de suplemento seletivo (Oxoid SR 156) (Citrato férrico amoniacal 0,5g/L, ácido nalidíxico, 20mg/L e Cloreto de acriflavina 25g/L de meio base), incubou-se a 37°C por 24/48 horas, bem como transferiu-se com alça de platina 5 µL para Ágar ALOA (Biolife 4016052) adicionado de suplemento seletivo (Biolife – 423501) (ácido nalidíxico 10 mg/L, ceftazidina 10 mg/L, cycloheximide 50 mg/L, polimixina B 38350 UI e L- α -fosfatidilinositol 1 g). Incubou-se o Ágar ALOA por 24/48 horas a 35°C e o caldo Fraser 24/48 horas a 37°C em estufa bacteriológica. Do caldo Fraser após 24 e 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a leitura da hidrólise de esculina e, sendo positiva ou negativa, transferiu-se com auxílio de alça de platina 5µL para Ágar ALOA e incubou-se por 24/48 horas a 35°C.

Transferiu-se as colônias características com halo de cor azul esverdeada, para Ágar motilidade (BBL 211436) e incubou-se por 3 dias a 22°C, bem como efetuou-se o teste de catalase com peróxido de hidrogênio a 3%, teste de motilidade por microscopia em contraste de fase, teste CAMP (Ágar base de sangue de carneiro Newprov), utilizando cepa de *Staphylococcus aureus* 25923 (Oxoid) e cepa de *Rodococcus equi* ATCC 6939 (Oxoid), prova sorológica com soro polivalente (Difco 2302-50-0), além do teste de fermentação de ramnose (Phenol Red Broth base Difco 292100).

Foram consideradas como sendo *L. monocytogenes* as leituras com testes positivos para: catalase, motilidade (em forma de guarda chuva), ramnose, CAMP teste frente a *S. aureus* e, para aglutinação frente ao soro polivalente (Figura 1).

2.3 Método ISO11290-1/A1 modificado (1)

Esse procedimento difere do item 2.2 pela substituição do caldo Fraser por caldo MOPS-BLEB no enriquecimento seletivo (Figura 2).

2.4 Método PCR BAX System[®] segundo protocolo do fabricante

Um total de 70 gramas de amostra foi homogeneizado em 140 g de solução fisiológica em homogeneizador peristáltico por 2 minutos, e deixada decantar por +/- 3 minutos. Após decantação da amostra por +/- 3 minutos, 30 mL de amostra foi transferido para 70 mL de caldo Demi Fraser concentrado 1,285 vezes, e incubado por 24/26 horas a 30°C e então transferido 0,1 mL para 10 mL de caldo MOPS-BLEB (Tecra TLEMED 500), que incubou-se por 24 horas a 37°C.

Após o enriquecimento da amostra em caldo MOPS-BLEB, ligou-se o termociclador/detector e o computador; esperou-se um minuto e iniciou-se a utilização do BAX System[®] com a digitalização dos dados da amostra conforme instrução do manual do usuário. Adicionou-se 150 µL de protease para 12 mL de tampão lise e transferiu-se 200 µL do reagente de lise para cada tubo de reação lise. A este tubo de reagente lise adicionou-se 5 µL da amostra proveniente do caldo de enriquecimento seletivo (MOPS-BLEB, ou caldo Fraser, quando usado método modificado de enriquecimento seletivo) utilizando ponteiras descartáveis; fechou-se os tubos e efetuou-se a reação de lise. Para *Listeria monocytogenes* a reação foi realizada a 55°C por 60 minutos para ocorrer à lise celular e a digestão de proteínas, e depois 95°C por 10 minutos para inativação da protease. Estas operações foram realizadas em blocos aquecedores para tubos de PCR previamente aquecidos. Os tubos foram então resfriados em bloco de resfriamento previamente mantidos em geladeira. Os tubos permanecem neste bloco por cerca de 5 minutos. Pipetou-se então 50 µl de amostra contida nos tubos de lise para tubos contendo tablete de PCR acondicionados no bloco de resfriamento e fechou-se com tampas óticas com auxílio de ferramenta específica fornecida pelo fabricante. Levou-se o bloco para o termociclador/detector e deu-se início ao programa automatizado. Após amplificação, uma janela se abre e cada poço aparece com uma cor diferente e um símbolo no centro de cada poço. Um sinal de menos indica que o teste é negativo para o organismo alvo (Figura 3).

2.5 Método USDA/FSIS modificado

Esse procedimento foi modificado pela substituição do Ágar Oxford Modificado por Ágar ALOA.

Um total de 70 gramas de amostra foi homogeneizado em 140 g de solução fisiológica em homogeneizador peristáltico por 2 minutos, e deixada decantar por +/- 3 minutos. Após decantação da amostra em 5.2.1, transferiu-se 30 mL de amostra para saco Whirl-Pak estéril (Nasco) contendo 70 mL de caldo UVM concentrado 1,285 vezes (Oxoid CM 863), adicionado de suplemento seletivo (Oxoid SR 142E) (ácido nalidíxico 20 mg/L de meio base e acriflavina HCl 12 mg/L de meio base). Incubou-se o caldo UVM a 30°C por 24 horas e, após incubação, transferiu-se 0,1 mL para 10 mL de caldo Fraser (Oxoid CM 895) adicionado de suplemento seletivo (Oxoid SR 156) (Citrato férrico amoniacal 0,5g/L, ácido nalidíxico, 20mg/L e Cloreto de acriflavina 25g/L de meio base), que incubou-se a 37°C por 24/48 horas. Transferiu-se também 5 µL com auxílio de alça de platina para Ágar ALOA que incubou-se por 24/48 horas a 35°C. Do caldo Fraser, depois de registrada a leitura de esculina, transferiu-se 5 µL, com auxílio de alça de platina, para Ágar ALOA e incubou-se por 24/48h a 35°C. Das colônias características para *Listeria monocytogenes* procedeu-se às reações bioquímicas e sorológicas citadas no item 2.2 (Figura 4).

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi feita conforme o teste não paramétrico de McNemar (SIEGEL, S. 1956), $(|ND - PD| - 1)^2 / (ND + PD) = \chi^2$ ($\chi^2 > 3,84$ é significativo ao nível de $p = 0,05$) e conforme a norma ISO 16140, para amostras naturalmente contaminadas, item 5 – Métodos Qualitativos – Protocolo técnico para suas validações, onde são definidos:

- f) Concordância relativa (RA): Grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas;

- g) Desvio Positivo (PD): O método alternativo se torna um falso positivo quando mostra um desvio positivo se ele indica um resultado positivo quando o método de referência indica um resultado negativo;
- h) Desvio Negativo (ND): O método alternativo indica um desvio negativo se ele dá um resultado negativo quando o método de referência dá um resultado positivo;
- i) Sensibilidade relativa (RS): Capacidade do método alternativo para detectar o alvo quando ele é detectado pelo método de referência;
Especificidade relativa (RE): Capacidade do método alternativo de não detectar o alvo quando ele não é detectado pelo método de referência;

O cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa para *Listeria monocytogenes* é apresentado na Tabela 1.

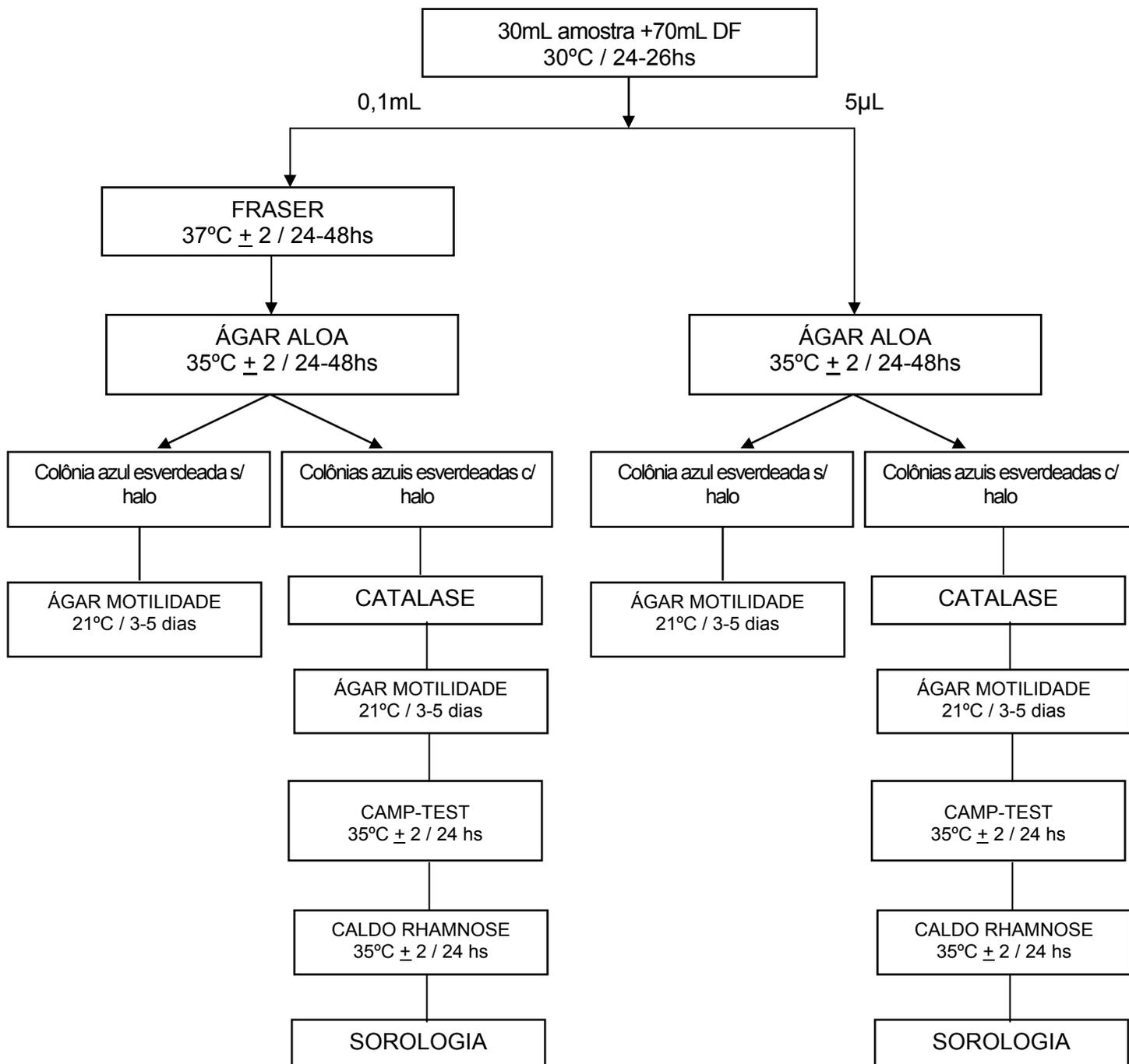


Figura 1. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método ISO 11290-1/A1.

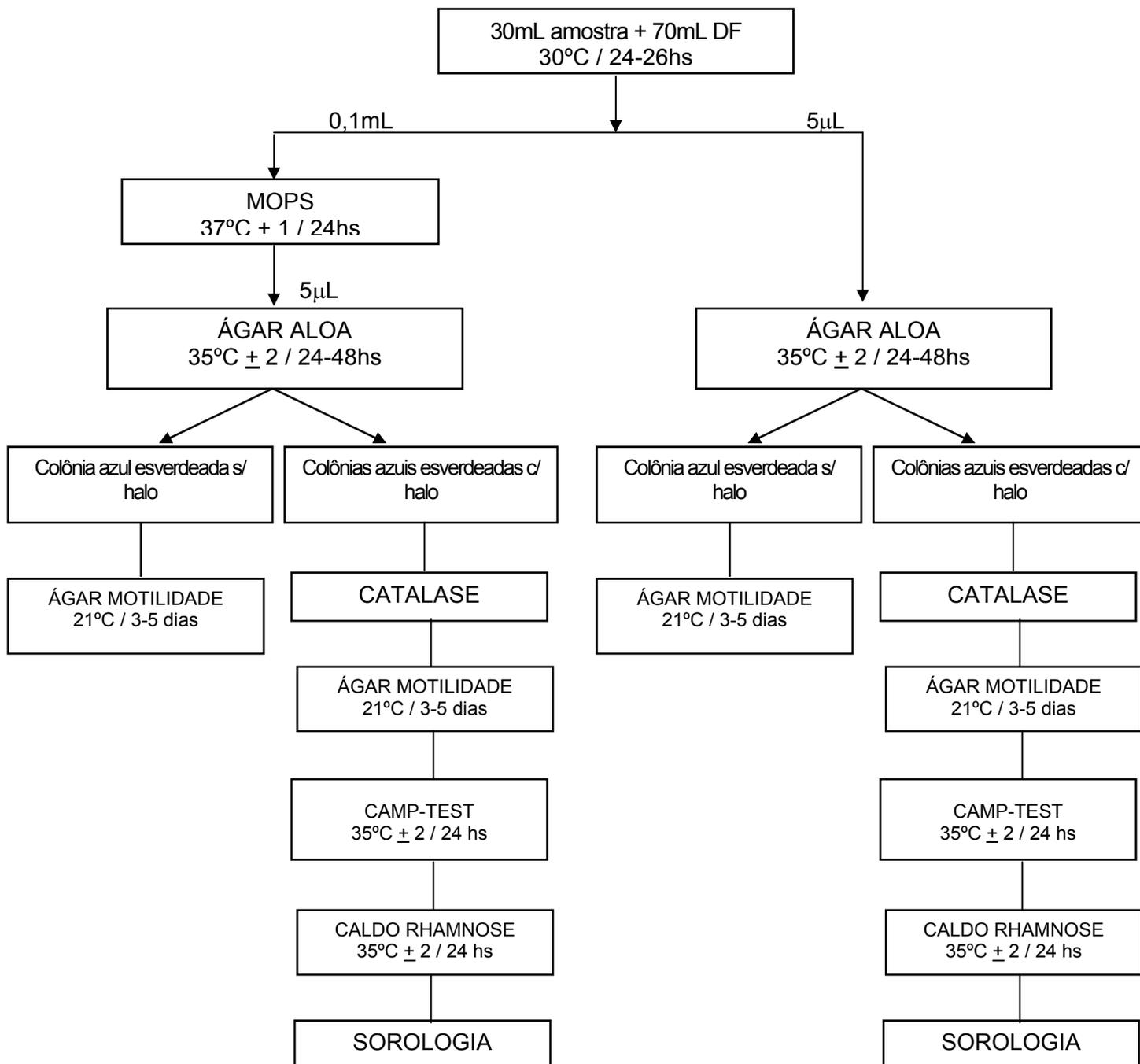


Figura 2. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método ISO 11290-1/A1

Modificado.

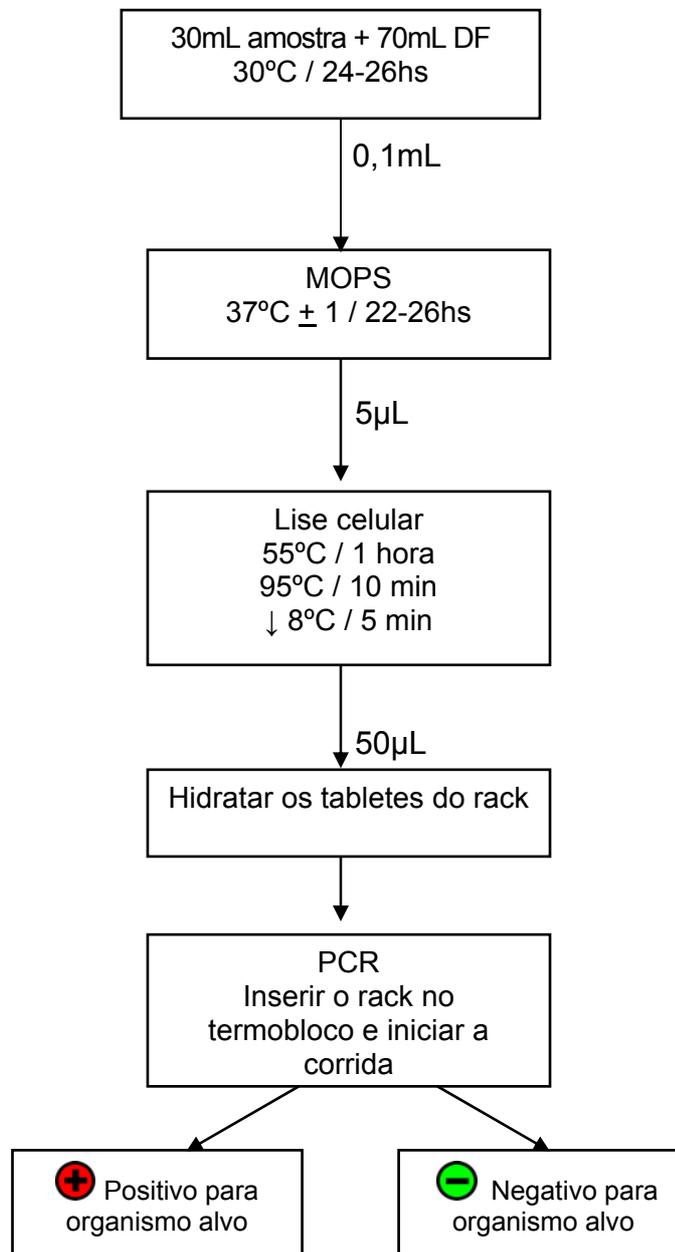


Figura 3. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo BAX System®.

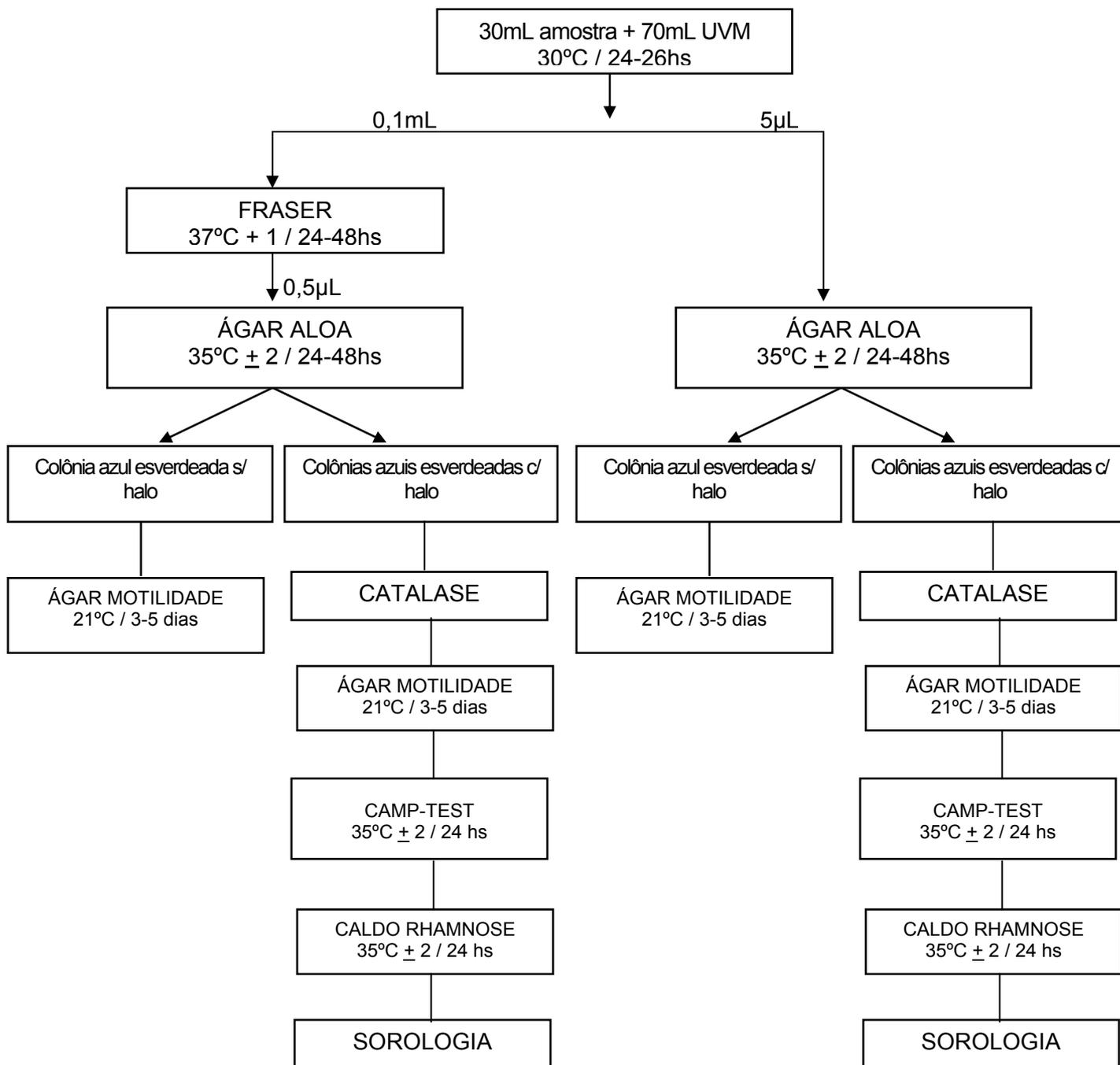


Figura 4. Detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método USDA/FSIS

Modificado.

Tabela 1: Cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa na detecção de *Listeria monocytogenes*.

Métodos		PA (++)	NA (--)	ND (+-)	PD (-+)	X ²	Sum	PA + NA	Concordância Relativa RA (%)	N+	Sensibilidade Relativa RS (%)	N-	Especificidade Relativa RE (%)
Referencia	Alternativo						N		100x(PA + NA) N	PA + ND	100x PA N+	NA + PD	100x NA N-
ISO	BAX	158	135	12	29	6,24	334	293	87,72	170	92,94	164	82,31
ISO Modificado	BAX	158	144	3	29	19,53	334	302	90,42	161	98,13	173	83,23
ISO	ISO modificado	157	160	13	4	3,76	334	317	94,91	170	92,35	164	97,56
USDA Modificado	BAX	145	127	20	42	7,11	334	272	81,43	165	87,88	169	75,14
ISO	USDA Modificado	139	138	31	26	0,28	334	277	82,93	170	81,76	164	84,14
USDA	ISO modif.	130	138	35	31	0,13	334	268	80,23	165	78,78	169	81,65

Legenda:

RE - Especificidade Relativa;

RS - Sensibilidade Relativa;

RA - Concordância Relativa;

PA - concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA - concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

PD - Desvio positivo (método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);

ND - Desvio negativo (método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);

3 RESULTADOS

Os resultados desse estudo mostram que:

O método **ISO 11290-1/A1** (DFA + DFFA) isolou 170 cepas de *Listeria monocytogenes* versus 187 do **BAX System**[®], sendo concordantes 158 e 135 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 29 amostras foram positivas para o **BAX System**[®] e negativas para o método ISO e 12 amostras positivas no método ISO e negativas no **BAX System**[®]. O χ^2 igual a 6,24 (p=0,0125) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 87,72 %, a especificidade relativa foi de 82,31 % e a sensibilidade relativa foi de 92,94%. O **BAX System**[®] apresentou uma taxa de falso negativo de 7,06 % e a taxa de falso positivo de 17,69 % (Tabela 2 e Tabela 3)

O método **ISO modificado** (DFA + DFMA) isolou 161 cepas de *L. monocytogenes* versus 187 do **BAX System**[®], sendo concordantes 158 e 144 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 29 amostras foram positivas para o **BAX System**[®] e negativas para o método cultural e três amostras positivas no método cultural e negativo no **BAX System**[®]. O χ^2 igual a 19,53 (p=0,00001) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 90,42 %, a especificidade relativa foi de 83,23% e a sensibilidade relativa foi de 98,13%. O **BAX System**[®] apresentou uma taxa de falso negativo de 1,87% e a taxa de falso positivo de 16,77% (Tabela 2 e Tabela 3).

O Método **USDA/FSIS modificado** (UVMA + UVMFA) isolou 165 cepas de *L. monocytogenes* versus 187 do **BAX System**[®], sendo concordantes 145 e 127 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 42 amostras foram positivas para o **BAX System**[®] e negativas para o método USDA/FSIS e 20 amostras positivas no método USDA/FSIS e negativas no **BAX System**[®]. O χ^2 igual a 7,11 (p=0,0077) demonstra diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 81,43%, a especificidade relativa foi de

75,14 % e a sensibilidade relativa foi de 87,88%. O BAX System[®] apresentou uma taxa de falso negativo de 12,12 % e a taxa de falso positivo de 24,86% (Tabela 2 e Tabela 3).

A combinação dos métodos de isolamento em Ágar ALOA a partir dos caldos de pré-enriquecimento DF (**ISO**) e UVM (**USDA/FSIS modificado**) comparadas ao **BAX System[®]** resultou em 164 amostras positivas e 130 amostras negativas, respectivamente, para ambos os métodos. 17 amostras foram negativas no BAX System[®] e positivas na combinação de caldos de pré enriquecimento e 23 amostras foram positivas no BAX System[®] e negativas na combinação de caldos de pré-enriquecimento. Não há diferença estatística ($\chi^2 = 0,625$; $p=0,4292$) entre os métodos de isolamento a partir dos caldos de pré-enriquecimento comparadas ao BAX System[®] (Tabela 4).

Comparando todos os meios culturais combinados (**ISO 11290-1/A1**, **ISO modificado** e **USDA/FSIS modificado**) versus o **BAX System[®]** temos 176 e 126 amostras foram positivas e negativas para a combinação dos métodos respectivamente. 21 amostras foram positivas em pelo menos um dos métodos culturais e negativas no BAX System[®] e 11 amostras foram positivas no BAX System[®] e negativas nos métodos culturais ($\chi^2 = 2,53$; $p=0,111$). Das 11 amostras positivas no BAX System[®] e negativas nos métodos culturais, oito foram sorotipadas no Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) como *Listeria innocua* e três como *Listeria innocua* não tipável (Tabela 4).

O método **ISO** (DFA + DFFA) isolou 170 cepas de *Listeria monocytogenes* versus 165 do método **USDA/FSIS modificado**, (UVMA + UVMFA), sendo concordantes 139 e 138 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 26 amostras foram positivas para o método USDA/FSIS e negativas para o método ISO e 31 amostras positivas no método ISO e negativas para o método USDA/FSIS. O χ^2 igual a 0,280 ($p=0,5962$) não demonstra diferença estatística entre os métodos. Juntos, isolaram 196 amostras positivas para *L. monocytogenes*. A concordância relativa foi de 82,93 %, a especificidade relativa foi de 84,14 % e a sensibilidade relativa foi de 81,76%. O método

USDA/FSIS modificado apresentou uma taxa de falso negativo de 18,24 % e a taxa de falso positivo de 15,86 % (Tabela 2 e Tabela 3).

Considerando-se o plaqueamento direto para Ágar ALOA, das culturas provenientes dos caldos de enriquecimento primário, ou seja, UVM (**USDA/FSIS modificado**) e DF (**ISO**), observaram-se 99 amostras positivas e 153 amostras negativas concordantes para ambos os métodos. 44 amostras foram positivas no caldo DF e negativas no UVM, e 38 amostras foram positivas no UVM e negativas no DF. Não há diferença estatística significativa entre os isolados a partir de quaisquer dos caldos utilizados ($\chi^2 = 0,30$; $p=0.5808$). Juntos isolaram 181 amostras positivas para *Listeria monocytogenes* (Tabela 2).

O isolamento a partir dos caldos de enriquecimento secundários (caldo Fraser) oriundos dos caldos de pré enriquecimento Demi Fraser (**ISO**) e UVM (**USDA/FSIS modificado**) houve menos isolamentos de *L. monocytogenes* no total das amostras analisadas, com 178 isolados positivos, sendo 142 amostras positivas quando oriundas do caldo UVM e 149 positivas quando oriundas do caldo Demi Fraser. 113 amostras foram positivas para ambos os caldos e 156 negativas. A partir do caldo MOPS isolou-se somente 138 amostras positivas.

Quando se testou o método **ISO 11290-1/A1** (DF + F + ALOA) de 289 isolados Frazer esculina positiva, 241 confirmaram ser *Listeria* spp em Ágar ALOA, dos quais 148 foram *L. monocytogenes* e 93 *Listeria* sp, porém 48 amostras esculina positivo não confirmaram ser *Listeria* spp. Por outro lado, de 45 amostras Frazer esculina negativas, duas confirmaram ser *Listeria* spp no Ágar ALOA, das quais uma foi *L. monocytogenes* e a outra *Listeria* sp. A amostra que resultou positiva para *L. monocytogenes*, também foi positiva, a partir do plaqueamento direto do caldo UVM, para Ágar ALOA, no protocolo **USDA/FSIS modificado**. A amostra dada como *Listeria* sp, foi positiva para esculina a partir do caldo UVM com 24 horas, mas negativa para *Listeria* sp após plaqueamento em Ágar ALOA, conforme disposto na Tabela 5.

A Tabela 5 apresenta o método **USDA/FSIS modificado** (UVM + F+ ALOA), de 279 isolados Frazer esculina positivos, 229 confirmaram ser *Listeria* spp em Ágar ALOA, dos quais 142 foram *L. monocytogenes* e 87 *Listeria* sp. Porém, 50 isolados esculina positivos não confirmaram ser *Listeria* spp no Ágar ALOA. Esta amostra foi positiva para esculina em caldo Fraser quando originada do caldo Demi-Fraser e dada como *Listeria* sp nas demais condições do estudo. Este último resultado confirma o encontrado quando se testou o método **ISO 11290-1/A1**.

O método **ISO modificado** (DFA + DFMA) isolou 161 cepas de *L. monocytogenes* versus 165 do **USDA/FSIS modificado** (UVMA + UVMFA), sendo concordantes 130 e 138 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. 31 amostras foram positivas para o método ISO modificado e negativo para o método USDA/FSIS modificado e 35 amostras positivas no método USDA/FSIS modificado e negativo para o método ISO modificado. O χ^2 igual a 0,1363 ($p=0,7119$) não demonstra diferença estatística entre os métodos. Juntos, isolaram 196 amostras positivas para *L. monocytogenes*. A concordância relativa foi de 80,23%, a especificidade relativa foi de 81,65% e a sensibilidade relativa foi de 78,78%. O método ISO modificado apresentou uma taxa de falso negativo de 21,22% e a taxa de falso positivo de 18,35% (Tabela 2 e Tabela 3).

O método **ISO 11290-1/A1** (DFA + DFFA) isolou 170 cepas de *L. monocytogenes* versus 161 do método **ISO 11290-1/A1 modificado** (DFA + DFMA), sendo concordantes 157 e 160 amostras positivas e negativas, respectivamente, em ambos os métodos. Quatro amostras foram positivas para o método ISO modificado e, negativas para o método ISO 11290-1/A1 e 13 amostras positivas no método ISO 11290-1/A1 e negativas para o método ISO modificado. O χ^2 igual a 3,76 ($p=0,0524$) não demonstra diferença estatística entre os métodos. Juntos, isolaram 174 amostras positivas para *L. monocytogenes*. A concordância relativa foi de 94,91%, a especificidade relativa foi de 97,56% e a sensibilidade relativa foi de 92,35%. O método ISO modificado apresentou uma

taxa de falso negativo de 7,65% e a taxa de falso positivo de 2,44 % (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2: Detecção de *Listeria monocytogenes* pelas metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®.

	ISO11290-1/A1 (DF-F-A)			ISO 11290-1/A1 modif. (DF-M-A)			USDA/FSIS modif. (UVM-F-A)			ISO11290-1/A1 (DF-A)		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
BAX System®												
Positivo	158	29	187	158	29	187	145	42	187	-	-	-
Negativo	12	135	147	3	144	147	20	127	147	-	-	-
Total	170	164	334	161	173	334	165	169	334	-	-	-
USDA/FSIS modif. (UVM-F-A)												
Positivo	139	26	165	130	35	165	-	-	-	-	-	-
Negativo	31	138	169	31	138	169	-	-	-	-	-	-
Total	170	164	334	161	173	334	-	-	-	-	-	-
ISO 11289-1/A1 modif. (DF-M-A)												
Positivo	157	4	161	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negativo	13	160	173	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	170	164	334	-	-	-	-	-	-	-	-	-
USDA/FSIS modif. (UVM-A)												
Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99	38	137
Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44	153	197
Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	143	191	334

Legenda:

DF = Caldo Demi-Fraser
 F = Caldo Fraser
 A = Agar Aloa
 M = Caldo MOPS
 UVM = Caldo UVM

Tabela 3. Resultados estatísticos da detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras de salsichas resfriadas, bacon, carcaças de frango resfriado e carnes suínas cruas pelas metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®.

Métodos	X ²	Valor p	RA	RE	RS	FP	FN
ISO x BAX	6,24	0,013	87,72	82,31	92,94	17,69	7,06
ISOm x BAX	19,53	0	90,42	83,23	98,13	16,77	1,87
USDA x BAX	7,11	0,007	81,43	75,14	87,88	24,86	12,12
ISO x USDA	0,28	0,59	82,93	84,14	81,76	15,86	18,24
ISO x ISOm	3,76	0,052	94,91	97,56	92,35	2,44	7,65
USDA x ISOm	0,13	0,71	80,23	81,65	78,78	18,35	21,22

Legenda:

RE – Especificidade Relativa;
 RS – Sensibilidade Relativa;
 RA – Concordância Relativa;
 FP – Falso Positivo;
 FN – Falso Negativo.

Tabela 4. Detecção de *L. monocytogenes* em amostras de salsichas resfriadas, bacon, carcaças de frango resfriado e carnes suínas cruas pela combinação das metodologias ISO 11290-1/A1, ISO 11290-1/A1 Modificado, USDA Modificado e BAX System®.

BAX	ISO11290-1/A1 USDA/FSIS modif.			ISO11290-1/A1 ISO 11290-1/A1 modif. USDA/FSIS modif.		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	164	23	187	176	11	187
Negativo	17	130	147	21	126	147
Total	181	153	334	197	137	334

Tabela 5. Identificação de *Listeria* spp a partir da reação de esculina de isolados obtidos pela metodologia ISO 11290-1/A1 e USDA/FSIS modificado.

	ISSO 11290-1/A1		USDA/FSIS modificado	
	Caldo Fraser Esculina +	Caldo Fraser Esculina -	Caldo Fraser Esculina +	Caldo Fraser Esculina -
<i>Listeria monocytogenes</i>	148	1	142	0
<i>Listeria</i> sp	93	1	87	1
Não <i>Listeria</i> sp	48	43	50	54

ISO 11290-1/A1 ⇒ Demi-Fraser → Fraser → Agar ALOA

USDA/FSIS modificado ⇒ UVM → Fraser → Agar ALOA

4 DISCUSSÃO

Os resultados das comparações de protocolos analíticos para análise de *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos, com o método ISO 11290-1/A1 e USDA/FSIS modificado, tidos como método de referência neste estudo, indicam que o uso de um único protocolo de isolamento pode resultar em 13 a 16% a menos de resultados positivos para *L. monocytogenes*. Apesar de este índice parecer alto, não apresentou diferença estatística significativa quando comparados entre si. Combinados os dois métodos, a taxa de isolamento de *L. monocytogenes* subiu de 86,73 % para 99,49 %. Na comparação do método ISO 11290-1/A1 versus o método ISO modificado com utilização do caldo MOPS como enriquecimento secundário, temos 2,30 a 7,47% de resultados positivos a menos, dependendo da escolha de um método em detrimento de outro; juntos, eles isolariam 88,32 % das amostras positivas.

A combinação do método USDA/FSIS modificado versus o método ISO modificado com utilização do caldo MOPS como enriquecimento secundário, temos novamente entre 16 a 18% de resultados positivos a menos, também sem nenhuma diferença estatística entre eles. Combinando os dois métodos, a taxa de isolamento de *L. monocytogenes* subiria de 84,18 % para 99,49 %. Resultados similares foram obtidos por Pritchard e Donnelly (1999), onde o percentual de *Listeria* sp isolada inicialmente por um só método de enriquecimento, passou de 82,5 % para 97,5 % quando realizada em combinação de dois métodos de pré enriquecimento (UVM e LRBS). Segundo estes mesmos autores, outros pesquisadores (FLANDERS et al., 1995, LUND et al., 1991, WARBURTON et al., 1991, NOAH et al., 1991., e HAYES et al., 1992) obtiveram resultados similares estudando recuperação de listérias a partir de mais de um caldo de enriquecimento. Pritchard e Donnelly (1999), de acordo com seus estudos, relatam que: “a verdadeira incidência de *Listeria monocytogenes*, possivelmente presente em amostras, podem não estar sendo detectadas nos protocolos

analíticos existentes e serem por isto subestimada”. Evidência esta que também podemos constatar em nossos dados.

Os resultados tanto do método ISO 11290-1/A1 e ISO 11290-1/A1 modificado, quanto do método USDA/FSIS modificado, demonstraram que na maioria dos casos *L. monocytogenes* é isolada já a partir do pré-enriquecimento. O enriquecimento secundário rendeu sempre algumas amostras positivas a mais.

Nossos resultados indicam também a necessidade do plaqueamento inicial a partir do caldo de pré enriquecimento, por termos amostras que se mostram positiva neste e negativas quando semeadas a partir do enriquecimento secundário. 14,28% das amostras positivas de 161 analisadas deixariam de ser isoladas, caso não fossem semeadas a partir do caldo de pré-enriquecimento no método ISO modificado. 12,35% das amostras positivas de 170 analisadas deixariam de ser isoladas, caso não fossem semeadas a partir do caldo de pré-enriquecimento no método ISO 11290-1/A1 e, 13,94% das amostras positivas deixariam de ser isoladas de um total de 165 amostras positivas analisadas no método USDA/FSIS modificado. Possivelmente, a razão para que tenhamos amostras positivas para *L. monocytogenes* não isoladas a partir do enriquecimento em caldo Fraser ou caldo MOPS e positivas no pré-enriquecimento – UVM ou Demi Fraser – pode estar relacionada a pouca competitividade da *Listeria monocytogenes* quando em presença de *Listeria innocua* nos caldos de enriquecimento secundários, fato este já comprovado por outros autores (SCOTTER, et al., 2001; PETRAN & SWANSON, 1993; CORNU, et al., 2002).

Neste estudo, das 23 amostras negativas para *L. monocytogenes* oriundas do caldo MOPS, 21 eram *Listeria* sp e 2 negativas para *Listeria* spp, e quando oriundas do caldo Fraser, das 21 amostras, 20 foram *Listeria* sp e 1 negativa para *Listeria* spp. Estas amostras foram positivas para *L. monocytogenes* no caldo Primário (Demi Fraser). 23 amostras oriundas do caldo Fraser, já tidas como *Listeria monocytogenes* a partir do caldo UVM, foram classificadas como *Listeria* sp.

Na análise de validação do protocolo analítico do BAX System[®], observamos que este difere significativamente dos protocolos ISO, ISO modificado e USDA/FSIS modificado (χ^2 - 6,24, 19,53 e 7,11 respectivamente). Estes resultados comprovam a necessidade de confirmação dos resultados positivos no BAX System[®], podendo o mesmo ser considerado um método *screening* e, portanto, somente válido como diagnóstico final para amostras com resultado negativo.

As vantagens de rapidez na obtenção de resultados do BAX System[®] para amostras negativas, podem ser discutidas pelo sistema de enriquecimento secundário, onde o caldo MOPS sugerido pelo fabricante não leva indicador de esculina. Todas as amostras devem prosseguir a análise utilizando o “kit” para análise de PCR proposto pelo fabricante. Por sua vez, a leitura de esculina negativa com 24 horas no caldo Fraser já pode nos levar a um indício de negatividade para *Listeria* spp e, levando em consideração que o caldo MOPS é incubado somente 24 horas, na comparação entre os dois caldos de enriquecimento secundário não teríamos necessidade de continuar a análise no BAX System[®] em culturas com leitura de esculina negativa. Neste caso, teríamos que utilizar os dois caldos de enriquecimento secundário (MOPS e caldo Fraser), caso optássemos pela adoção do protocolo analítico proposto para o BAX System[®]. Segundo a metodologia ISO, a leitura do caldo Fraser deve ser efetuada também após 48 horas para dar um resultado negativo.

Os resultados de leitura de atividade esculinase nos caldos Fraser a partir do caldo Demi Fraser mostraram, que 139 amostras foram positivas para *L. monocytogenes* com leitura positiva em caldo Fraser com 24 horas e 9 amostras foram positivas após 48 horas de incubação. O isolamento de *L. monocytogenes* em Ágar ALOA a partir do caldo Demi Fraser, foi de 139 amostras presuntivamente positivas (colônias características azuladas com halo opaco) com leitura concordante de esculina positiva em 24 horas, e duas a partir do caldo Fraser positivo com 48 horas. Considerando as amostras presuntivamente positivas a partir do plaqueamento em Ágar ALOA e, adicionalmente, a leitura de

esculina no caldo Fraser oriundo do caldo de pré-enriquecimento, pelo menos 139 amostras não teriam necessidade de continuidade de análise pelo kit BAX System[®]. Isto pode gerar uma economia em kits não usados do BAX System[®], ou ainda, poder-se-ia confirmar as colônias características isoladas no Ágar ALOA utilizando o próprio Kit do BAX System[®], como opção de método de identificação.

A opção de pré-enriquecimento pelo método USDA/FSIS, com 48 horas temos pelo menos 137 amostras presuntivamente positivas para *L. monocytogenes*, considerando a leitura de esculina positiva em caldo Fraser após 24 horas e colônia característica de *L. monocytogenes* em Ágar ALOA semeado a partir do caldo UVM.

A validação de novas metodologias analíticas, bem como de diferentes protocolos analíticos em laboratórios de controle de qualidade têm por objetivo, hoje, a otimização dos trabalhos internos, baseados na procura do método que renda o maior número possível de amostras positivas. Isto se deve à adequação de novas tendências aos princípios de segurança alimentar sustentado pelas empresas de alimentos mais preocupadas em servir com qualidade de excelência seus clientes: os consumidores.

Neste estudo de validação de métodos analíticos para detecção de *L. monocytogenes*, a mão de obra empregada para a atividade de pré-enriquecimento é a mesma para os protocolos analisados. Uma atividade extra nos protocolos USDA/ISO seria o plaqueamento direto em Ágar ALOA, mas que poderia em 24 horas resultar em *screening* positivo, se colônias características presentes, e a mesma atividade para a transferência de 0,1 mL para o caldo Fraser ou para o caldo MOPS no caso do uso do protocolo BAX System[®]. A vantagem do caldo Fraser sobre o caldo MOPS após 24 horas de incubação seria a leitura de esculina com 24 horas em caldo Fraser. O escurecimento do meio é considerado presuntivamente positivo para *Listeria* sp. necessitando de confirmação, enquanto que, culturas sem alteração de cor do meio podem ser consideradas negativas (International Journal of Food Microbiology, 9 (1989) 94-96 FOOD 00M03). Já teríamos também uma leitura prévia do Ágar ALOA, que

mesmo com colônias pequenas, mas características após incubação a 37 C por 24 horas, já poderiam ser visualizadas, dependendo da experiência dos técnicos de laboratório. Colônias sem halo e esculina positivas em caldo Fraser com 24 horas de incubação, poderiam ser consideradas como negativa, e, neste caso, o custo benefício da análise com o KIT PCR deve ser avaliado.

Devemos considerar, também, que o número de amostras positivas no BAX System[®] (187), se considerado isoladamente o protocolo de isolamento do BAX System[®] como preconizado pelo fabricante, resultaria em 49 amostras falso positivo, pois o número de isolados em Ágar ALOA a partir do caldo MOPS somente rendeu 138 amostras positivas. Como um método *screening* os resultados devem ser confirmados. Desta forma, o protocolo do BAX System[®] deveria considerar a semeadura em ágar seletivo diferencial também a partir do pré-enriquecimento, o que certamente levaria a uma grande economia de consumo do KIT da PCR, e mesmo neste caso, como opção, poderia a PCR ser usada como prova de confirmação genética de células viáveis a partir de colônias isoladas em Ágar ALOA.

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo comprovam que a tecnologia de PCR para detecção de *L. monocytogenes* é uma ferramenta valiosa para análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade de alimentos. Após 48 horas já é possível trabalhar o KIT analítico do BAX System[®] e aproximadamente após 5 horas ter o diagnóstico final da análise se negativo e, na possibilidade de combinação com métodos culturais semeados a partir do pré-enriquecimento em Ágar diferencial como o Ágar ALOA, a partir de colônias característica para *L. monocytogenes* também resultados finais positivos.

Os protocolos analíticos propostos pela ISO e USDA modificado com semeadura em Ágar ALOA a partir dos caldos de pré-enriquecimento, podem também gerar resultados positivos presuntivamente sem necessidade de custos e mão de obra adicionais uma vez que a semeadura a partir dos caldos de pré enriquecimento (UVM + DF) isolou um número maior *L. monocytogenes* que a semeadura a partir do caldo Fraser e caldo MOPS como enriquecimento secundário. Constata-se, novamente, que ainda não existe somente um caldo de pré enriquecimento que nos possa levar a isolamentos de 100% de amostras positivas. Pelos resultados apresentados, o uso dos dois caldos de pré-enriquecimento (DF e UVM) teriam uma vantagem sobre o BAX System[®], com o mesmo tempo para obtenção de resultados negativos e presuntivamente positivos, além do que estes métodos comparados não apresentaram diferença estatística entre si e resultam em maior número de amostras positivas, confirmadas pela provas bioquímicas.

Desta forma, podemos concluir que os caldos de enriquecimento também necessários aos protocolos dos “chamados métodos rápidos”, se bem usados e interpretados, podem ser utilizados também com o conceito de métodos rápidos devido a leitura de certas propriedades bioquímicas que neles ocorrem devido as reações metabólicas que ocorrem durante a multiplicação bacteriana; e, devido a esta característica, podem abreviar o tempo de análise e serem rápidos nos

conceitos dos métodos rápidos utilizados nos dias de hoje como apelo de vendas e, inclusive, serem mais econômicos.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANONYMOUS. **International Journal of Food Microbiology**, 9, p. 94-96
FOOD 00M03; 1989;

COOK, V. Isolation and identification of *L. monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. U.S. Department of agricultura, food safety and inspection services, **microbiology laboratory guidebook**, 3rd Ed. Washington, DC. 1999;

CORNU, M., KALMOKOFF, M., FLANDROIS, J.P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p. 261-274, 2002;

DUARTE, G., MANUELA, V., CAPELL, A., GIBBS, P. Efficiency of four enrichment protocol in differentiation and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* from smoked fish chains. **Journal Food Microbiology**, v. 52, p. 163-168, 1999;

FLANDERS, K.J., PRITCHARD, T.J. DONNELLY, C.W. Enhanced recovery of *Listeria* from dairy-plant processing environments through combined use of repair enrichment/detection procedures. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 404-409; 1995;

HAYES, P.S., GRAVES, L.M. SWAMINATHAN, B., AJELLO, G.W., MALCOLM, G.B., WEAVER, R.E., RANSON, R., DEEVER, K., PLIKAYTIS, B.D., SCHUCHAT, A., WENGER, J.D., PINNER, R.W., and BROOME, C.V., and the *Listeria* STUDY GROUP Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 952-959b, 1992;

International Standard Organization, ISO 16140:2003(E) - **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, 2003;**

International Standard Organization, ISO 11290-1/A1, 2004. **Microbiology – General guidance for the detection of *Listeria monocytogenes*, 2004;**

LUND, A.M., ZOTTOLA, E.A. PUSCH, D.J. Comparison of methods for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 602-606, 1991;

NOAH, C.W., PEREZ, J.C., RAMOS, N.C., McKEE, C.R., GIPSON, M.V., Detection of *Listeria* species in naturally contaminated seafood using four enrichment procedures. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 174-177 1991;

PETRA, R.L., SWANSON, K.J. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 616-618, 1993;

PRITCHARD, T.J., DONNELLY, C.W. Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 532-535, 1999;

SCOTTER, S.L., LANGTON, S., SCHULTEEN, S., NAGELKERTE, P.H. IN'T, VELD, ROLLIER, P., LAHELLEC, C. Validation of ISO method 11290 Part 1 – Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 295-306; 2001;

SIEGEL, S. **Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences**. New York: McGraw Hill, pg. 350, 1956;

SKOVGAARD, N. Current topics in food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 239-242, 2002;

WARBURTON, D.W., FARBER, J.M., ARMSTRONG, A., CALDEIRA, R., HUNT, T, MESSIER, S., PLANTE, R., TIWARI, N.P., VINET, J. A collaborative study of the FDA and USDA methods for detection of *Listeria monocytogenes* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 105-108, 1991.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir após a finalização deste trabalho, que o método AOAC 993/07 (MSRV Acumedia) com pH 5,4 +/-0,2 é o método mais sensível para a detecção de *Salmonella* sp em carcaças de frango e carnes suínas cruas, e deveria ser também considerado para uso com este fim. O método BAX System[®] pode ser utilizado como método *screening* para análise de *Salmonella* spp, pois pode adiantar o resultado definitivamente negativo após 24 horas, mas como *screening*, deve em casos presuntivamente positivos ter a confirmação dos seus resultados confirmados com um método cultural para o resultado definitivo da análise.

O método ISO 6579, hoje tido como método de referência para todos os tipos de alimentos, deveria ser repensado quanto a ser referência em detrimento do método AOAC 993-07/ISO 6579: amd1(E), também para carnes e produtos cárneos.

Para análise de *Listeria monocytogenes*, fica claro que não há um método de pré enriquecimento que se possa dizer seja absoluto e, portanto, mais pesquisas são necessárias para encontrar um meio que venha a ter excelente rendimento para isolar o patógeno em carnes e produtos carneos prontos para consumo.

Os métodos alternativos (como a PCR) também podem e devem ser usados como análise de *screening*, pois nos dão a vantagem do rápido diagnóstico de detectar amostras negativas e aliam-se a possibilidade de serem usados como provas determinativas de confirmação a partir de colônias isoladas.

8 TRABALHOS FUTUROS

- a) Avaliação das metodologias alternativas aqui apresentadas com diluição 1: 5 versus 1:10 para análises de *Listeria monocytogenes*, utilizando o modelo de regressão logística multinomial;**

- b) Avaliação da metodologia quantitativa por NMP de *Salmonella* sp usando o meio MSRV;**

- c) Comparação de metodologia quantitativa por NMP de *Salmonella* sp usando o meio MSRV versus a frequência de isolados positivos:**

- d) Avaliação do caldo APT para enriquecimento de patógenos múltiplos (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* termotolerantes em produtos carneos, e sua correlação com a contagem destes patógenos).**

- e) Explorar os dados aqui apresentados e publicá-los utilizando a ferramenta apresentada para análise estatística de métodos analíticos conforme publicação de Ogliari et al., 2007.**