

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANDRIELE MONIQUE SIRENA
RENATA ALANA PEDROSO

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE
Salmonella sp

PONTA GROSSA
2012

**ANDRIELE MONIQUE SIRENA
RENATA ALANA PEDROSO**

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE
*Salmonella sp***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, da Coordenação de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientador: Prof Esp. Ewerson Evaldo Henke.

**PONTA GROSSA
2012**



TERMO DE APROVAÇÃO

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO SALMONELLA sp.

por

ANDRIELE MONIQUE SIRENA
RENATA ALANA PEDROSO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 06 de julho de 2012 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Esp. Ewerson Evaldo Henke
Professor Orientador

Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri
Membro titular

Prof. Me. José Mauro Giroto
Membro titular

DEDICATÓRIA

À família por todo apoio e incentivo,
dedicamos este trabalho.

A vocês, todo nosso amor e carinho.

AGRADECIMENTOS.

À professor Ewerson Evaldo Henke pela sua orientação, acompanhamento, dedicação, confiança e paciência conosco durante este trabalho.

À professora Maria Helene Giovanetti Canteri pela sua colaboração conosco durante este trabalho.

Agradecemos à família por todo apoio, dedicação e compreensão durante o curso.

Aos amigos que fizeram parte de nossa trajetória até aqui, especialmente a Gabriella Cristina Serenato, por toda ajuda e compreensão.

Ao Frigorífico pelo espaço e material cedido, pela experiência fornecida por parte de seus colaboradores.

Agradecemos a Deus acima de tudo, por ter nos concedido o dom da vida e por ter nos dado o privilégio de concretizar esta vitória.

“Você é aquilo que faz, não o que diz “

"Tudo posso naquele que me fortalece"

Felipenses 4:13

RESUMO

SIRENA, A.M; PEDROSO, R.A **Comparação de Metodologias para Detecção de *Salmonella* sp.** 2012. Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em alimentos Universidade Tecnológica Federal do Paraná 2012.

Foi realizada a comparação entre os métodos BAX System® (DuPont-Qualicom) e Ágar semi-sólido rappaport vassiliadis (MSRV) para detecção de *Salmonella* sp em carcaças de frango naturalmente contaminadas, coletadas durante o abate num período de 12 meses. Logo após a coleta as amostras foram encaminhadas para o laboratório e num intervalo máximo de 5 horas, foram submetidas à análise de *Salmonella* sp. Das 250 amostras de carcaça de frango 14% foram positivas no método BAX System® e 16,4% no MSRV. Nenhuma diferença significativa, estatisticamente, entre os métodos comparados ao nível de 5%.

Palavras - chave: BAX System®. MSRV. *Salmonella* sp. carcaças de frango.

ABSTRACT

SIRENA, A.M; PEDROSO, R.A **Comparison of Methods for Detection of Salmonella sp.** 2012. Completion of course work in food Technology Federal Technological University of Parana in 2012.

Comparisons were made between the methods BAX ® System (DuPont-Qualicom) and agar semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) for detection of Salmonella in naturally contaminated chicken carcasses were collected during slaughter within 12 meses. Logo after samples were collected were gathered for the lab and a maximum interval of five hours, were analyzed for Salmonella sp. Of the 250 samples of chicken carcasses were positive in 14% BAX ® System Method and 16.4% in MSRV. No significant differences statistically between the methods compared to the 5% level.

Key-words: BAX®System. MSRV. Salmonella sp. Chicken carcasses.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL.....	10
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS	11
2.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS.....	11
2.3 DIFERENÇA ENTRE INFECÇÃO E INTOXICAÇÃO.....	12
2.4 SALMONELOSES.....	12
2.5 TIPOS DE SALMONELLA	13
2.6 <i>SALMONELLA</i> SP EM AVES	14
2.7 MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE <i>SALMONELLA</i> SP.....	15
2.7.1 Ágar semi-sólido Rappaport Vassiliadis (MSRV)	15
2.7.2 Reação em Cadeia de Polimerase	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 MÉTODO SALMONELLA MÓVEL ÁGAR SEMI-SÓLIDO RAPPAPORT VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV).....	19
3.2 MÉTODO BAX <i>System</i> ® (DuPont-Qualicom)	20
3.3 DIAGRAMA DOS MÉTODOS BAX E MSRV.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ágar semi-sólido com resultado ausente para <i>Salmonella</i> sp.....	23
Figura 2 - Ágar semi-sólido com resultado suspeito para <i>Salmonella</i> sp	24
Figura 3 – Placa de Ágar seletivo XLD/ BPLS com suspeita de <i>Salmonella</i> sp.....	24
Figura 4 - Tubos de TSI/LIA mostrando um teste com presença de <i>Salmonella</i> sp.	25
Figura 5 - Preparo do Aparelho BAX System®.....	26
Figura 6 - Preparo dos tubos de Reação Lise.	26
Figura 7 - Amostra de 25 g homogeneizada em caldo APT.....	27
Figura 8 - Pipetou-se 5 µL da amostra homogeneizada em caldo APT para cada tubo Lise. .	27
Figura 9 - Aquecimento dos tubos de reação lise.....	28
Figura 10 -Preparo do tubos lise para termociclador.....	28
Figura 11 - Pipetou-se 50 µl dos tubos de reação lise, para o tablete de PCR.	29
Figura 12 - Entrada no termociclador.....	29
Figura 13 - Resultado em porcentagem de amostras positivas para <i>Salmonella</i> sp.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das 250 amostras de carcaças analisadas neste trabalho.....	31
Tabela 2 - Resultado das 250 carcaças de frango analisadas para método MSR _V e BAX System®	31
Tabela 3 - Resultados concordantes em % para método BAX System® e MSR _V	32
Tabela 4 - Tabela ANOVA para resultado de comparação estatística entre os métodos BAX System® e MSR _V ao nível de 5%	34

1 INTRODUÇÃO

Segundo SOUSA (2006), os microrganismos podem estar presentes no ambiente natural do homem (água, solo, ar e poeira), no próprio homem e em todos os seres vivos. Assim, qualquer alimento consumido pode estar contaminado por microrganismos. Um alimento pode se tornar alterado (com perda das características organolépticas próprias e de seu valor comercial) e até ocasionar, no consumidor, infecções e intoxicações alimentares, dependendo do seu nível de contaminação microbiana e de suas características.

De acordo com SOUSA (2006), um alimento pode apresentar riscos à saúde humana, de acordo com os seguintes fatores:

- I) manipulação inadequada;
- II) uso de matérias primas cruas e contaminadas;
- III) contaminação e/ou crescimento microbiano;
- IV) uso inadequado de aditivos químicos;
- V) adição acidental de produtos químicos;
- VI) poluição ambiental e degradação de nutrientes .

Existem inúmeros relatos sobre intoxicações e infecções humanas resultantes do consumo de alimentos contaminados por microrganismos especialmente os patogênicos. Dentre eles se encontra a salmonelose, causada pela *Salmonella* sp.

Estudos de JAY (2005) apresentam a *Samonella* sp como uma das principais bactérias envolvidas em surtos de doenças de origem alimentar como febre tifoide, 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.

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

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.

A técnica mais utilizada para detecção de *Salmonella* sp 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 mais utilizados por laboratórios nos dias atuais são: Método Cultural Clássico, Reação em cadeia da Polimerase (PCR), Ágar semi-sólido Rappaport Vassiliadis Modificado (MSRV) (FRANCHIN 2006).

O interesse da indústria de alimentos é encontrar método que detecte o maior índice possível de amostras positivas, com o objetivo da melhor resposta aos procedimentos de prevenção e monitoramento do programa de redução de patógenos adotado pela empresa e reduzindo a frequência deste patógeno. Mais especificamente, o objetivo é estar seguro de 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* sp 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 empresa (FRANCHIN 2008).

1.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os métodos, MSRV e o BAX System® pelo método PCR (Reação em cadeia da Polimerase) na detecção de *Salmonella* sp em amostras de carcaças de frango naturalmente contaminadas.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparação entre os métodos em relação a tempo de resultado positivo e negativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICRORGANISMOS NOS ALIMENTOS

Cada vez mais os consumidores se preocupam com a qualidade dos alimentos que consomem, esperando consumir um alimento com qualidade e livre de patógenos. A indústria de alimentos vem se comprometendo a cada dia com recursos e programas de redução de patógenos para atingir o objetivo de satisfazer o cliente com um produto saudável e de qualidade.

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

SOUSA (2006) afirma que as empresas buscam sempre obter a máxima rentabilidade do produto, mas devem atentar, sobretudo, em cumprir com os requisitos legais e atender as características de satisfação do consumidor.

De acordo com SOUSA (2006) um alimento seguro é aquele cujos constituintes ou contaminantes que podem vir a causar perigos à saúde estão ausentes ou em baixa concentração.

2.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS

As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, bolores, protozoários e vírus. As bactérias, pela sua diversidade e patogenicidade, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos. (DENNIS, 1996).

A transmissão dessas doenças pode ocorrer de forma direta (como a ingestão da água ou dos alimentos) ou indireta, no preparo de alimentos, na higiene pessoal, na agricultura e no lazer. Os principais microrganismos presentes na água e em alimentos contaminados e responsáveis pelas numerosas doenças são: *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Brucella* sp, *Vibrio* sp, *Yersinia enterocolitica*. Há microrganismos coliformes que tem como habitat natural, o trato intestinal do homem e de animais. Pertencem à família

Enterobacteriaceae, incluindo muitos gêneros, tendo como principais a *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Citrobacter*. (LIMA, 2002).

2.3 DIFERENÇA ENTRE INFECÇÃO E INTOXICAÇÃO

A alimentação dentro dos padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde; a deficiência nesse controle é responsável pela ocorrência de surtos de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define DTA como doenças de origem infecciosa ou tóxica causadas pelo consumo de água ou alimento contaminado. As DTA se dividem em dois grandes grupos: infecções e intoxicações alimentares (SOARES, 2006).

Para que ocorra a infecção alimentar, faz-se necessária a ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos vivos. É uma doença produzida por microrganismos capazes de invadir a parede intestinal e se multiplicarem para outros órgãos, caracterizando a infecção (SOARES, 2006).

A intoxicação alimentar é a patologia causada pelo consumo de alimentos contaminados por bactérias, fungos, vírus e outros microrganismos ou sua toxina. Os sintomas clínicos estão relacionados ao trato digestivo como náuseas, vômitos e diarreias. A manifestação clínica vai depender de alguns fatores como virulência do agente, inóculo da infecção e competência imunológica do hospedeiro. Desta forma, pode-se observar que a relação alimento-saúde é de grande importância para a população, sendo necessário difundir conhecimentos que a protejam dos riscos inerentes ao consumo alimentar (SOARES, 2006).

2.4 SALMONELOSES

As *Salmonellas* sp são pequenos bastonetes gram-negativos, não-esporulados, distribuídas na natureza e tem o homem e os animais como seus principais reservatórios. (JAY, 2005).

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 equinos. Carnes cruas e mal cozidas, leite cru, ovos e seus respectivos derivados, são veículos frequentes do microrganismo, sendo frequentes também as contaminações cruzadas de matérias primas e alimentos processados, tanto de origem animal como vegetal (FRANCHIN, 2006).

Atualmente as infecções causadas pela bactéria do gênero *Salmonella* sp são mundialmente consideradas como as mais importantes causas de doenças transmitida por alimentos (GERMANO PML, GERMANO MIS, 2001).

Segundo SANTOS (2002), a salmonelose é uma das zoonoses com maior impacto sobre a Saúde Pública em todo o mundo, devido à elevada endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade no controle.

No Brasil, a real prevalência da salmonelose não é conhecida, pois apesar de se tratar de uma doença de notificação compulsória, nem sempre os surtos são notificados às autoridades sanitárias, devido ao fato de que a maioria dos casos de gastroenterites transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado (SANTOS, 2002).

Segundo PELCZAR (1997), pessoas com mãos contaminadas, envolvidas na preparação de alimentos, podem inocular a *Salmonella* sp, e se o mesmo for estocado em local não refrigerado por muitas horas, a bactéria pode multiplicar-se, alcançando número suficiente para causar doença naqueles que o ingerirem.

Segundo JAY (1992), os produtos alimentares de origem animal como, por exemplo, carnes de frango e ovos são os maiores responsáveis pela distribuição mundial das salmoneloses e seus problemas subsequentes, pois esses alimentos têm sido os veiculadores de numerosos casos de infecções humanas por *Salmonella* sp.

2.5 TIPOS DE SALMONELLA

A classificação e a nomenclatura de *Salmonella* 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, divididos em 5 subespécies ou grupos, a maioria dos quais está classificada na chave da espécie *S. enterica*, que compreende as seguintes subespécies: grupo II (*S. enterica* subsp. *salamae*); grupo III.a (*S. enterica* subsp. *arizonae*); grupo III.b (*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 (FRANCHIN, 2006).

A *Samonella* da espécie *S. bongori* é considerada uma espécie ancestral raramente associada à doença em humanos. Atualmente o gênero é composto por cerca de 2.501

sorotipos diferentes, sendo 1.478 pertencentes a *Salmonella enterica*, que coloniza o trato entérico de animais de sangue quente sendo responsáveis por 99% das infecções. Os sorotipos de *Salmonella* podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro ou podem ser encontrados em um grande número de espécies animais (HENSEL, 2004).

A febre tifoide é causada somente por um sorotipo, a *Salmonella typhi*, apenas em seres humanos, transmitida somente por alimento ou água contaminados por fezes humanas. Após a ingestão os bacilos alcançam o intestino, aderem e penetram na parede intestinal, multiplicam-se próximo ao linfonodos e eventualmente invadem a circulação sanguínea. Caracteriza-se por febre prolongada, alterações do trânsito intestinal, aumento de vísceras como o fígado e o baço e, se não tratada, confusão mental progressiva, podendo levar ao óbito (PELCZAR 1997).

2.6 SALMONELLA SP EM AVES

Segundo (ABEF, 2011) as exportações de carne de aves (frango, peru, pato, ganso e outras) totalizaram 3,981 milhões de toneladas, correspondendo a uma receita de US\$ 7,244 bilhões. No caso da carne de frango foi registrado um novo recorde histórico nos volumes, com embarques de 3,819 milhões de toneladas. Com esse resultado o Brasil permanece na posição, conquistada em 2004, de maior exportador mundial de carne de frango.

A UBABEF também divulgou que a produção de carne de frango chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, em um crescimento de 11,38% em relação a 2009, quando foram produzidas 10,980 milhões de toneladas.

Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2010 teria somado 12,550 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,648 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA).

O crescimento em 2010 foi impulsionado principalmente pelo aumento de consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações. Como resultado da produção em 2010, o consumo per capita de carne de frango foi de 44 quilos no ano passado (ABEF, 2011).

Na Inglaterra e País de Gales, a carne de frango foi responsável por surtos e casos esporádicos e por aproximadamente 30.000 casos/ano de intoxicação alimentar em seres humanos (FRANCHIN 2006).

No Brasil, reportaram um aumento do isolamento de *Salmonella enteritidis* a partir de 1993. Na Itália, de 1991 a 1994, dos 1699 surtos de origem alimentar, *Salmonella* sp foi responsável por 81%, dos quais 34% foram *Salmonella enteritidis* (FRANCHIN 2006).

2.7 MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE *SALMONELLA* SP

A detecção de *Salmonella* sp em alimentos é um procedimento que pode levar de 4 a 7 dias quando a análise é realizada pela metodologia tradicional, sendo necessários 3 a 4 dias para obtenção de resultado negativo confirmatório neste método (BENNETT, 1998)

O métodos tradicional de detecção de *Salmonella* sp em alimentos envolvem cinco etapas sequenciais:

- a) o pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas (células que sofreram algum tipo de degradação) a uma condição fisiológica estável;
- b) o enriquecimento seletivo, no qual a amostra é novamente colocada em caldo de cultivo contendo reagentes inibitórios que permite a multiplicação de *Salmonella* sp, enquanto restringe a proliferação da maioria das outras bactérias;
- c) a semeadura em meios sólidos seletivos que restringem a multiplicação de outras bactérias que não sejam *Salmonella* sp;
- d) os testes bioquímicos, que fornecem dados fenotípicos da cultura isolada;
- e) a sorotipagem para caracterização antigênica, que é o passo definitivo e provê a identificação específica da cultura isolada (BAILEY, 1991).

Neste trabalho foram estudados dois métodos significativamente mais rápidos, sendo para a indústria alimentícia de grande importância. Os produtos fabricados são retidos até a liberação por resultados que comprovem produtos livres de patógenos. A redução deste período pode significar grandes ganhos econômicos, o que leva os profissionais da área a estar desenvolvendo novas alternativas analíticas.

2.7.1 ÁGAR SEMI-SÓLIDO RAPPAPORT VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV)

O princípio dos meios semi-sólidos está na obtenção de uma maior especificidade e facilidade de isolamento das cepas de *Salmonella*, porque estão combinados em um único meio de enriquecimento, o crescimento seletivo e a capacidade de produzir flagelos característica da maioria das cepas de *Salmonella* sp (FRANCHIN, 2008).

Os métodos de detecção por motilidade são técnicas de cultura mais simples. Os resultados negativos e presuntivamente positivos podem ser obtidos em 48 horas. Consistem 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* sp 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, 1993).

A superfície do meio MSR.V é inoculada com 0,1 mL de cultura pré-enriquecida (motilidade em enriquecimento direto) em 3 gotas equidistantes 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, 1996).

Amostras contendo microrganismos incapazes de migrar a 42 °C, mas sim em temperaturas inferiores, podem resultar em falso-positivas devido às 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, 1992).

As cepas de *Salmonella* sp, 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, 1987).

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* sp 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* sp, 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, 1994).

2.7.2 REAÇÃO EM CADEIADA 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 sequência 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 (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 sequencial, com base na sequência 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 sequências complementares do DNA alvo e ligue-se a estes (PONTES, 1999).

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®, 2003).

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 quatro passos: enriquecimento da amostra, extração de DNA, amplificação de DNA e leitura de resultados (MANUAL DO USUÁRIO BAX System®, 2003).

O BAX System® fornece detecção qualitativa de seções de DNA altamente específicas para *Salmonella* sp 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 sequência 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, permitindo a emissão de resultados (AOAC, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em frigorífico inspecionado pelo SIF, no estado do Paraná. A empresa atua no ramo alimentício, com produtos derivados de carnes de aves.

A pesquisa foi desenvolvida com o intuito de comparar dois métodos diferentes de análise para que se possa creditar e confiar na eficácia, agilidade e confiabilidade nos resultados. Colaborando na potencialização das ações de prevenção e monitoramento e consequentemente a redução da incidência destes patógenos.

As análises de *Salmonella* sp foram realizadas partindo-se de uma mesma amostra com alíquota de 25g, devido a fase de pré-enriquecimento ser igual para ambos métodos, seguindo-se simultaneamente o método Ágar semi-sólido Rappaport Vassiliadis modificado (MSRV) e o método BAX System®.

Para pesquisa, foram coletadas 250 amostras de carcaça de frango, aleatoriamente durante o abate em um período de 12 meses. Logo após a coleta as amostras foram encaminhadas para o laboratório e num intervalo máximo de 5 horas, foram submetidas à análise de *Salmonella* sp.

3.1 MÉTODO SALMONELLA MÓVEL ÁGAR SEMI-SÓLIDO RAPPAPORT VASSILIADIS MODIFICADO (MSRV)

A utilização do método *Salmonella* sp Móvel Ágar semi – sólido Rappaport Vassiliadis se deu como segue :

➤ Pré-Enriquecimento

Pesou-se 25 gramas +/- 0,5g de amostras em saco Whil-Pak (Nasco) em balança Dilumat 3 e adicionou-se 225ml de água peptonada tamponada (APT 1%). As amostras foram homogeneizadas em Stomacher 400 circulator Seward por um minuto e incubadas a 36 °C +/- 1 °C de 16 a 20 horas, temperatura controlada por registrador gráfico.

➤ Isolamento

Inoculado 0,1ml dividido em 3 gotas para placas de Agar MSRV, em 3 locais equidistantes, incubados a 42 °C +/- 0,5 °C por 24 +/- 3 horas, sem inverter as placas, temperatura controlada por registrador gráfico.

➤ Seleção

Realizou-se a leitura, observando a zona de migração no MSRV.

- Sem zona: ausência de *Salmonella* sp em 25g.
- Ausência de motilidade → Prova negativa → Para prova NEGATIVA é encerrada a análise (ver figura 1).
- Zona médio-pequena (<1cm): suspeita de *Salmonella* sp em 25g;
- Zona grande (>1cm): *Salmonella* sp positiva em 25g , presuntivamente (ver figura 2).

As placas com crescimento positivo ou suspeito (placas que apresentam zona de migração) foram transferidas por estreitamento para dois meios seletivos (XLD – Xilose Lisina Deoxycholate, BPLS – Ágar Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose). Estas placas foram incubadas a 36 °C +/- 1 °C por 24 +/- 3 horas (ver figura 3).

Coletar entre 3 a 10 colônias suspeitas e semear em tubos contendo Agar/caldo Ureia, TSI (Ágar Ferro Três açúcares) e LIA (Ágar Ferro Lisina), incubados a 36 °C +/- 1 °C por 18/24 horas. Teste Sorológico, com soro Polivalente “O”. Soro positivo análise encerrada (ver figura 4).

3.2 MÉTODO BAX *System*® (DuPont-Qualicom)

➤ Pré-Enriquecimento

Pesou-se 25 gramas +/- 0,5g de amostras em saco Whil-Pak (Nasco) em balança Dilumat 3 e adicionou-se 225ml de água peptonada tamponada (APT 1%). As amostras foram homogeneizadas em Stomacher 400 circulator Seward por um minuto e incubadas a 36 °C +/- 1 °C de 16 a 20 horas, temperatura controlada por registrador gráfico.

➤ Preparo do Equipamento

As amostras pré-enriquecidas foram submetidas à análise por PCR, utilizando o protocolo do fabricante do BAX *System*® (DuPont Qualicon): 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.

➤ Preparo para tubos de lise

Adicionou-se 150 µL de protease para 12 mL de tampão lise e transferiu-se 200µL 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 ponteiras descartáveis;

➤ Aquecimento

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 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 colocados em bloco de resfriamento previamente mantido em geladeira. Os tubos permaneceram neste bloco por cerca de 5 minutos em temperatura entre 8 a 10 °C.

➤ Preparação para termociclador

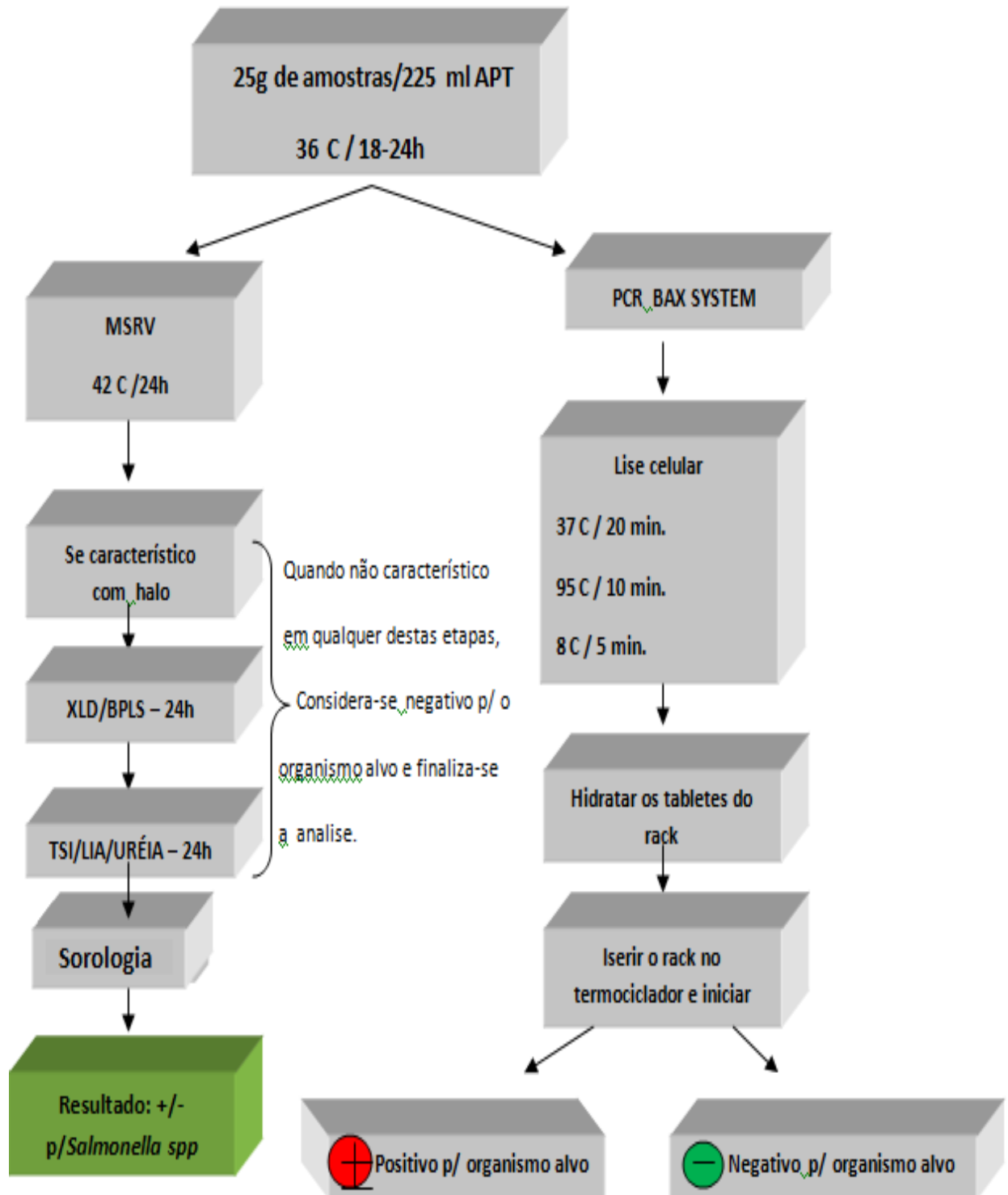
Pipetou-se então 50 µl de amostra contidas nos tubos de lise para tubos contendo tablete de PCR acondicionados no bloco de resfriamento e fechou-se com tampas óticas com auxílio de ferramenta específica fornecido pelo fabricante.

Levou-se o bloco para o termociclador/detector e deu-se inicio ao programa automatizado.

➤ Leitura de resultados

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* sp.

3.3 DIAGRAMA DOS MÉTODOS BAX E MSRV



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O frigorífico onde foram realizadas as análises para este trabalho utiliza dos métodos descritos abaixo pelo tempo de resposta, simplicidade e por exigência de alguns importadores.

- ✓ O Ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) é derivado de melhorias efetuadas ao longo do tempo no Caldo Rappaport. O caldo Rappaport, incubado a 35°C, é baseado na habilidade de *Salmonella* sp 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 feitas no caldo Rappaport, como: a redução na concentração de verde malaquita, o aumento na temperatura de incubação de 35°C para 42°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.

Na figura 1, é possível identificar a placa com MSRV com resultado negativo após incubação. Micro-organismos competidores não tem a mesma mobilidade que a *Salmonella* sp nas mesmas condições.



Figura 1 - Ágar semi-sólido com resultado ausente para *Salmonella* sp.

Fonte 1- Autoria própria.

Nesta figura 2 está exposto uma placa de MSR/V, com halos que se alastram por toda placa que mostram a motilidade do micro-organismo, caracterizando positivo para *Salmonella* sp.

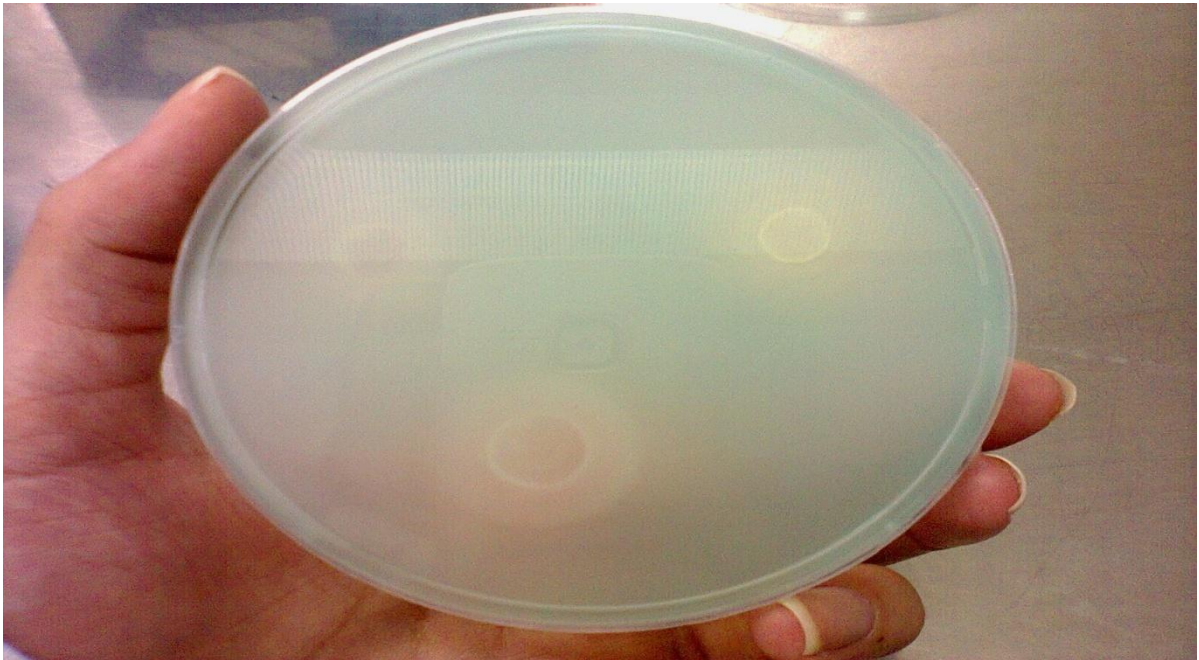


Figura 2 - Ágar semi-sólido com resultado suspeito para *Salmonella* sp

Fonte 2- Autoria própria.

A figura 4 mostra o Ágar XLD e BPLS com suspeita para *Salmonella* sp.

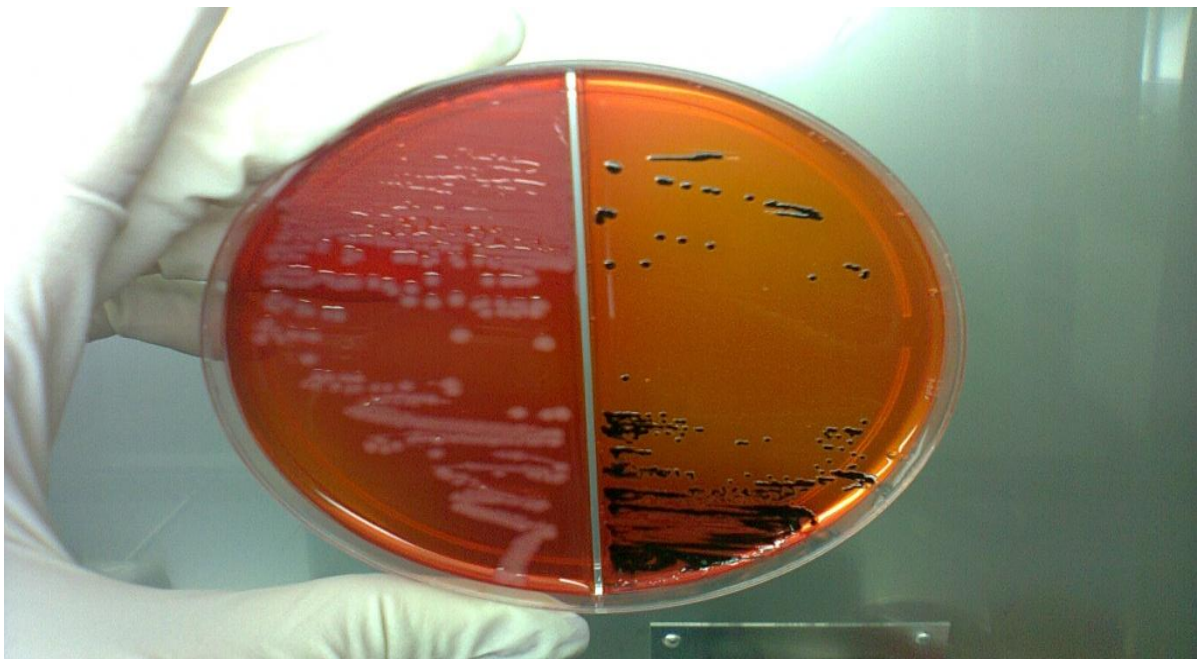


Figura 3 – Placa de Ágar seletivo XLD/ BPLS com suspeita de *Salmonella* sp.

Fonte 3 – Autoria própria.

A figura 4 mostra o teste com TSI e LIA positivos. O TSI com a rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com produção de H₂S (escurecimento do ágar) e o LIA com fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio) com produção de H₂S (escurecimento do meio).

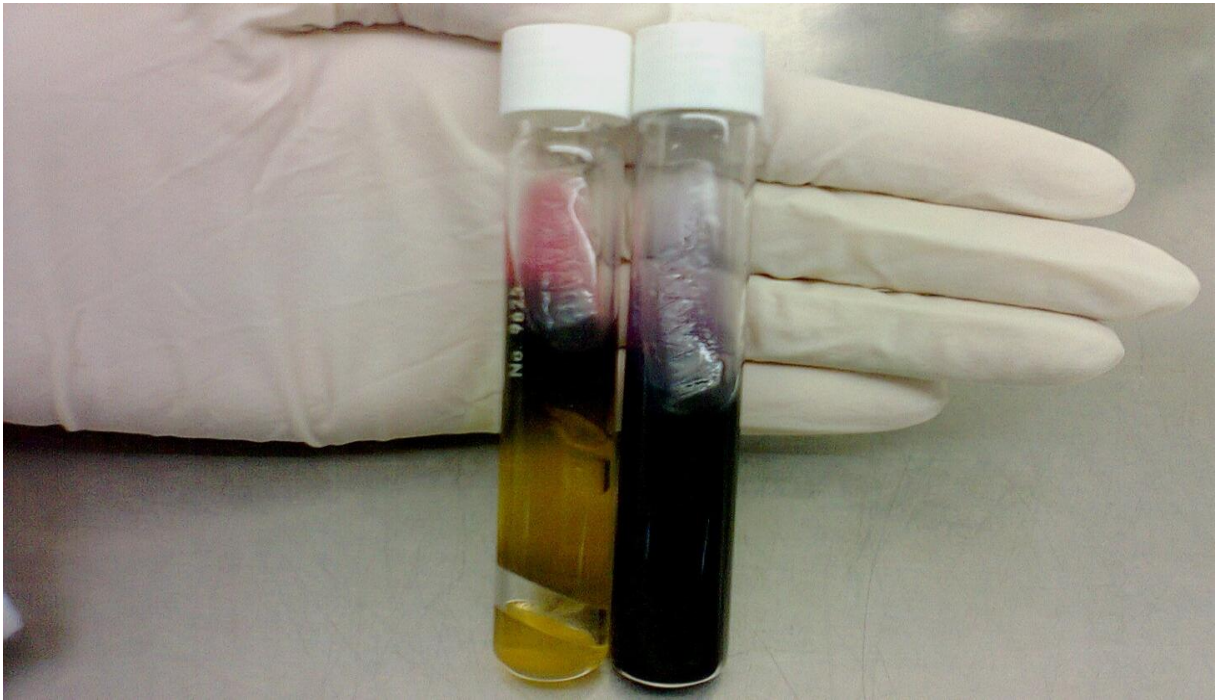


Figura 4 - Tubos de TSI/LIA mostrando um teste com presença de Salmonella sp.

Fonte 4 – Autoria própria

- ✓ Outro método realizado é Reação em cadeia da polimerase (PCR) com detecção automatizada com BAX System®, 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 sequência 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 (PONTES 1999).

A figura 5 e as subsequentes mostram a sequência do procedimento de análise do método BAX System®.



Figura 5- Preparo do Aparelho BAX System®.

Fonte 5- Autoria própria.

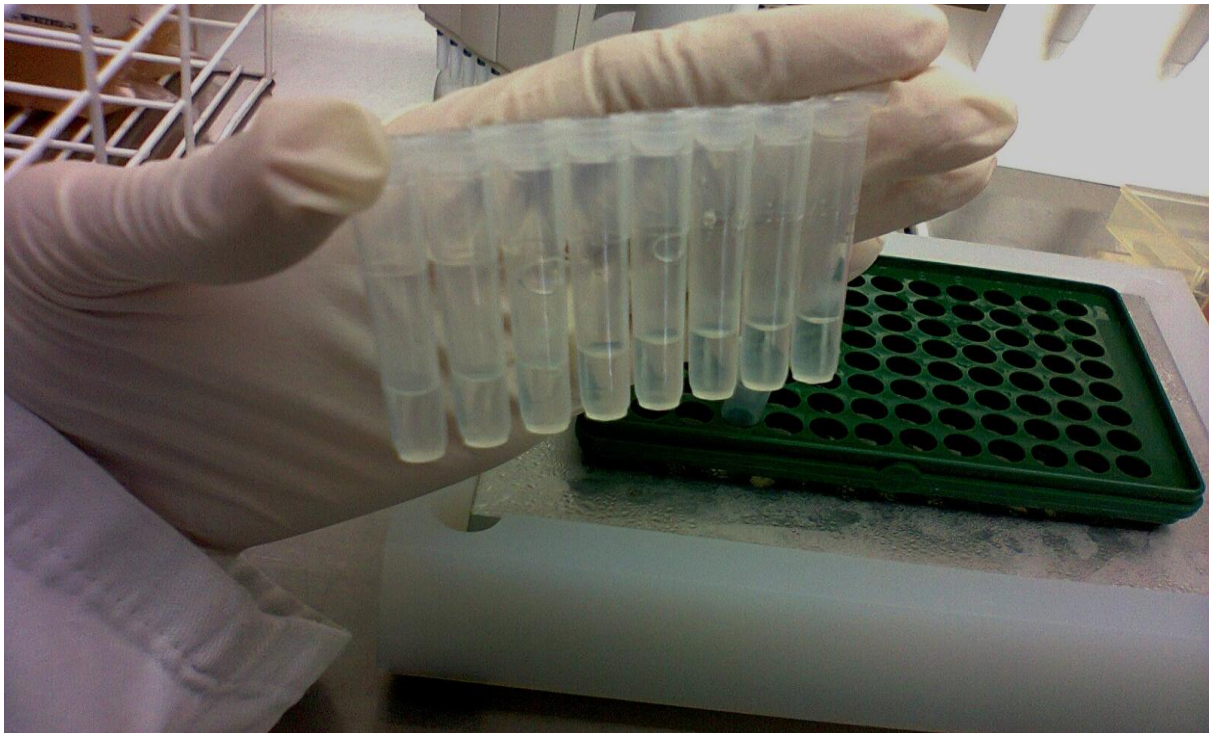


Figura 6- Preparo dos tubos de Reação Lise.

Fonte 6- Autoria própria.



Figura 7- Amostra de 25 g homogeneizada em caldo APT.

Fonte 7- Autoria própria.

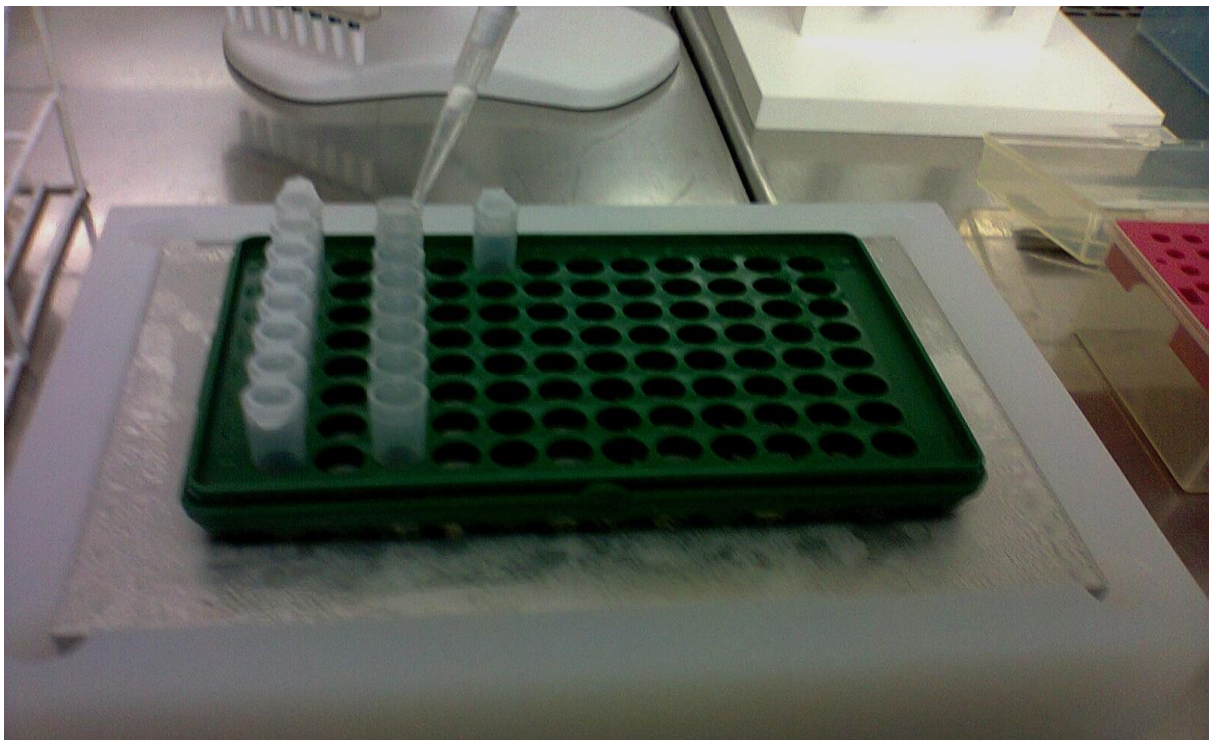


Figura 8- Pipetou-se 5 μ L da amostra homogeneizada em caldo APT para cada tubo Lise.

Fonte 8- Autoria própria.



Figura 9- Aquecimento dos tubos de reação lise

Fonte 9- Autoria própria.



Figura 10 -Preparo do tubos lise para termociclador

Fonte 10- Autoria própria.



Figura 11- Pipetou-se 50 μ l dos tubos de reação lise, para o tablete de PCR.

Fonte 11- Autoria própria.



Figura 12- Entrada no termociclador

Fonte 12- Autoria própria.

O método MSRVR detectou 41 amostras positivas contra 35 do método BAX System®. Das 41 amostras positivas no método MSRVR, 12 deram negativas no método BAX System®. No método BAX System® foram detectadas 35 amostras positivas das quais, 6 deram negativas para o método MSRVR, sendo concordantes 29 positivas e 203 negativas para ambos os métodos. Ou seja, 232 resultados concordantes.

A tabela 1 logo abaixo, mostra os resultados das 250 carcaças de frango. Comparando o método BAX e MSRVR.

TABELA DE RESULTADOS										
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
BAX	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
BAX	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
	C-31	C-32	C-33	C-34	C-35	C-36	C-37	C-38	C-39	C-40
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	C-41	C-42	C-43	C-44	C-45	C-46	C-47	C-48	C-49	C-50
BAX	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	P	N	N	N	N	N	P
	C-51	C-52	C-53	C-54	C-55	C-56	C-57	C-58	C-59	C-60
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	C-61	C-62	C-63	C-64	C-65	C-66	C-67	C-68	C-69	C-70
BAX	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N
	C-71	C-72	C-73	C-74	C-75	C-76	C-77	C-78	C-79	C-80
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
	C-81	C-82	C-83	C-84	C-85	C-86	C-87	C-88	C-89	C-90
BAX	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	C-91	C-92	C-93	C-94	C-95	C-96	C-97	C-98	C-99	C-100
BAX	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P
MSRV	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P
	C-101	C-102	C-103	C-104	C-105	C-106	C-107	C-108	C-109	C-110
BAX	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N
	C-111	C-112	C-113	C-114	C-115	C-116	C-117	C-118	C-119	C-120
BAX	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N
	C-121	C-122	C-123	C-124	C-125	C-126	C-127	C-128	C-129	C-130
BAX	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	C-131	C-132	C-133	C-134	C-135	C-136	C-137	C-138	C-139	C-140
BAX	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N
	C-141	C-142	C-143	C-144	C-145	C-146	C-147	C-148	C-149	C-150

BAX	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	P	N	N	P	N	N	P	N	N	N
	C-151	C-152	C-153	C-154	C-155	C-156	C-157	C-158	C-159	C-160
BAX	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P
MSRV	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
	C-161	C-162	C-163	C-164	C-165	C-166	C-167	C-168	C-169	C-170
BAX	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
MSRV	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
	C-171	C-172	C-173	C-174	C-175	C-176	C-177	C-178	C-179	C-180
BAX	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N
MSRV	N	N	N	N	N	P	P	N	P	N
	C-181	C-182	C-183	C-184	C-185	C-186	C-187	C-188	C-189	C-190
BAX	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N
MSRV	N	N	P	N	N	N	N	N	P	N
	C-191	C-192	C-193	C-194	C-195	C-196	C-197	C-198	C-199	C-200
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MSRV	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P
	C-201	C-202	C-203	C-204	C-205	C-206	C-207	C-208	C-209	C-210
BAX	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
MSRV	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
	C-211	C-212	C-213	C-214	C-215	C-216	C-217	C-218	C-219	C-220
BAX	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	C-221	C-222	C-223	C-224	C-225	C-226	C-227	C-228	C-229	C-230
BAX	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
MSRV	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
	C-231	C-232	C-233	C-234	C-235	C-236	C-237	C-238	C-239	C-240
BAX	P	N	N	P	N	N	P	N	N	N
MSRV	P	N	N	P	N	N	P	N	N	N
	C-241	C-242	C-243	C-244	C-245	C-246	C-247	C-248	C-249	C-250
BAX	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P
MSRV	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N

Tabela 1 – Resultados das 250 amostras de carcaças analisadas neste trabalho.

Fonte 1 – Autoria própria

Legenda: N (negativo)

P (positivo)

C (carcaça de frango)

	POSITIVO	NEGATIVO
BAX System®	35	215
MSRV	41	209

Tabela 2 - Resultado das 250 carcaças de frango analisadas para método MSRV e BAX System®

Fonte 2– Autoria própria.

RESULTADO	%
Positivo/Negativo	92,80%

Tabela 3 - Resultados concordantes em % para método BAX System® e MSR.V.

Fonte 3 – Aatoria própria.

A figura 13 está expondo o resultado em porcentagem de amostras positivas das análises de *Salmonella* sp .

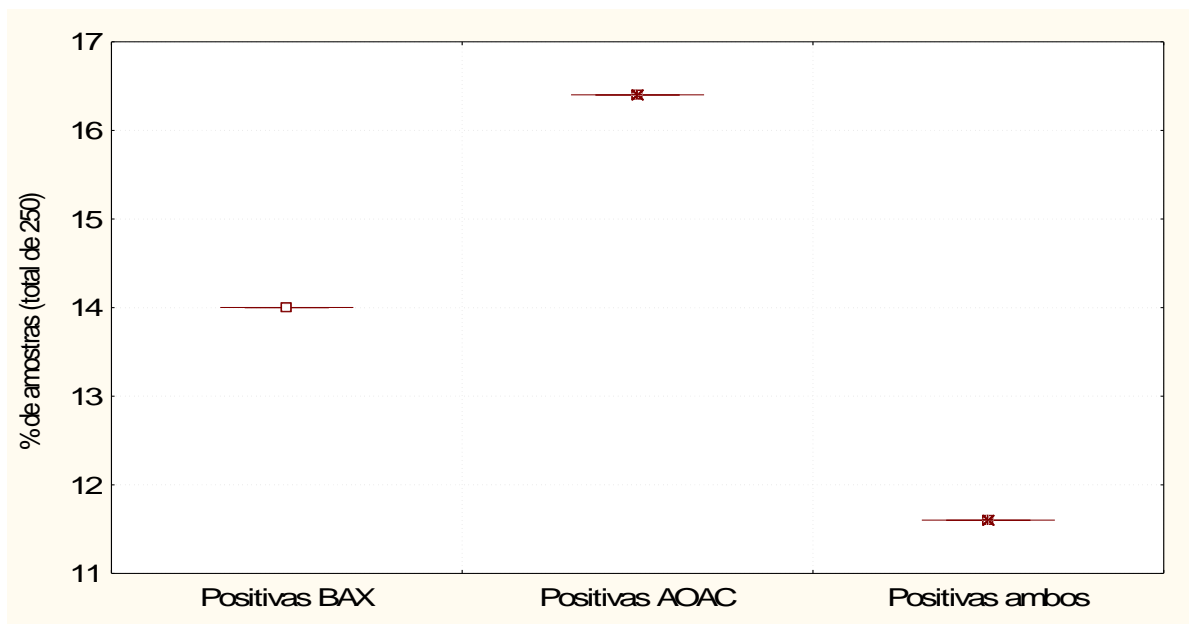


Figura 13- Resultado em porcentagem de amostras positivas para *Salmonella* sp

Fonte 13 Aatoria própria

A *Salmonella* sp foi detectada pelo método BAX System® em 14 % das amostras de carcaça de frango , em 16,4% pelo método MSR.V. Ambos os métodos concordam em 11,6% de amostras positivas, confirmando que as amostras de carcaça de frango indicaram maior sensibilidade pelo MSR.V.

De acordo com BENNETT (1998), o BAX foi sempre positivo quando a concentração de células de salmonela na água peptonada tamponada (APT) foi de, 5×10^3 UFC/mL ou maior. De acordo com DE SMEDT (1987), o método MSR.V 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. Isso é um dos fatores dos quais algumas amostras constaram positivas para o método MSR/V e negativas para o método BAX.

Para explicar as amostras positivas no BAX System® e negativas no MSR/V considera-se o estado fisiológico das células, porque pelo método BAX System® a detecção consiste a partir de um fragmento de DNA. O DNA pode ser persistente em células mortas e sendo amplificado pelo PCR. Daí surge à necessidade de uma confirmação em um método cultural com capacidade de detecção de células vivas para confirmação. Podendo assim ser utilizado o método MSR/V para confirmação, pois além de ser mais sensível também detecta apenas células vivas (FRANCHIN, 2006).

De acordo com o MANUAL DO BAX System® as vantagens são de combinar velocidade com a manipulação fácil e simples, reduz o potencial de erros tais como, contaminação cruzada, não necessita de interpretações por especialista e permite o processamento eficaz de um grande número de amostras por vez, sendo assim de grande valor para uso em laboratório em rotina. Porém por este método não é possível identificar as estirpes em estudos por não ser um método cultural.

O método MSR/V permite a diferenciação de *Salmonella* sp por meio da confirmação bioquímica e as estirpes podem ser submetidas a tipagem. Também permite a diferenciação com base na motilidade ativa desses microrganismos neste meio, pois a velocidade de migração desse microrganismo é maior comparada aos outros microrganismos. As amostras devem ser lidas imediatamente após serem tiradas da estufa, pois quando em temperatura ambiente podem possibilitar a atividade de outros microrganismos com essa temperatura ótima, podendo assim também formar halos.

Observou-se que, comparando os dois métodos detectou-se resultados negativos em tempos diferentes. Para o método BAX foi possível detectar resultado negativo ou positivo em apenas 3 horas após enriquecimento, comparando com o MSR/V que leva 24 horas para resultados negativos, porém quando positivo o resultado foi obtido após 3 dias.

ANOVA: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	3	28	9,333333	37,49333
Coluna 2	3	32,8	10,93333	33,97333

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,84	1	3,84	0,107463	0,759492	7,708647421
Dentro dos grupos	142,9333	4	35,73333			
Total	146,7733	5				

Tabela 4 - Tabela ANOVA para resultado de comparação estatística entre os métodos BAX System® e MSRVR ao nível de 5%

Fonte 4- Autoria própria

A tabela 4 está indicando o resultado de comparação estatística entre os métodos BAX System® e MSRVR ao nível de 5%, com objetivo de mostrar a eficácia e se há diferença significativa entre os métodos.

Estatisticamente não houve diferença significativa entre os métodos BAX System® e MSRVR, nos níveis de significância de 1 e 5 %. A tabela ANOVA mostra que F calculado é menor que F crítico indicando que os métodos são estatisticamente iguais.

Tendo em vista a equivalência dos métodos demonstrados pelo teste estatístico, ambos podem ser usados para análise de *Salmonella* sp para este tipo de amostra, tendo em conta o custo e necessidade de se obter um resultado rápido. A combinação das duas técnicas possibilita a vantagem de um resultado rápido, eliminação de resultados falsos positivos e falsos negativos. O microrganismo deverá ser isolado pelo método cultural (MSRV), utilizado

para fins epidemiológicos e ainda, a critério do laboratório, eliminar a possibilidade de falso positivo gerado pelo PCR (BAX System®) devido à possibilidade, mesmo que com pouca probabilidade, da amplificação de DNA de células mortas de *Salmonella* sp presentes na amostra, como consequência de processos industriais. Isto requer, um especialista com conhecimento de processos industriais, microbiologia de alimentos e métodos analíticos empregados para análise de amostras. Segundo FRANCHIN (2008), 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. Os resultados deste estudo comprovam a eficiência dos métodos para detecção de *Salmonella* sp em carcaça de frango.

5 CONCLUSÃO

Nas análises de *Salmonella* sp para o método MSR/V 16,4 % foram positivas e 14,0 % pelo método BAX System®, sendo que 92,8% dos resultados foram concordantes para ambos os métodos. Concluiu-se que é possível obter pelo método MSR/V o resultado negativo em 24h após o período de enriquecimento da amostra e quando a amostra é positiva o resultado é obtido em até 3 dias após este período. Para o método BAX, o resultado positivo ou negativo é obtido em 3 horas após enriquecimento da amostra. A combinação desses dois métodos analíticos aqui comparados (MSR/V e BAX System®) reflete num maior rendimento na detecção de amostras positivas, tem a vantagem de obtenção de resultado positivo ou negativo em 30 horas. Estatisticamente os métodos são iguais, sendo, tanto o método MSR/V quanto o BAX System® confiáveis para a detecção de *Salmonella* sp e sua combinação mais confiável, pois elimina resultados falsos positivos e falsos negativos gerando mais eficácia nas análises.

DECLARAÇÃO

Declaro a quem possa interessar que a aluna Renata Alana Pedroso utilizou as instalações do Laboratório de Microbiologia de Carambeí da BRF – Brasil Foods S.A. para a realização das suas atividades pertinentes ao seu trabalho de conclusão de curso. Sem mais a declarar,

Atenciosamente,



Northon Lee Drunkler
BRF - Brasil Foods S/A
Tecnólogo em Alimentos
CRQ 09201691

Northon Lee Drunkler

Supervisor de Laboratórios BRF – Brasil Foods S.A.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS – **ABEF**.

Disponível em: http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2389
.Acesso em 22 de julho 2012

AOAC RESEARCH INSTITUTE, **Performance Tested Method SM n° 070202 BAX System® with Automated Detection PCR Assay for Screening *L.monocytogenes***, July 24, 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

BENNETT, A.R., et al. 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

DENNIS, C; et al. Revista do Instituto Superior Politécnico de Viseu. Educação, Ciência e Tecnologia. **REVISTA MILLENIUM** . v.3 , n. 4, p. 91-100,out .1996. Disponível em: http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm. Acesso em 23 julho 2012

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

DE SMEDT, J.M., et al. ***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

FRANCHIN, Paulo R.. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de Salmonella SP e Listeria monocytogenes em carnes e produtos cárneos.** 2008.114p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008

FRANCHIN, P.R.; et al . **Comparação da BAX System® com um método MSR/V in-house para a detecção de Salmonella em carcaças de frango e carne de porco.** Braz. J. of microbiol. Vol. 37 no.4. São Paulo, dezembro de 2006

GERMANO PML, GERMANO MIS. **Higiene e Vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela; 2001

HENSEL, M. **Evolution of pathogenicity island of Salmonella enterica.** Inter. J. Med. Microbiol. v. 294, p. 95-102, 2004

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. P.507 a 526

JAY, James M. **Modern food microbiology.** 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1992

LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Infecções e intoxicações alimentares. In: **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos.** 1 ed. João Pessoa, PB: Nova Idéia, 2002, v. 1, p 175-199

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

O'DONOGUE, D., MORGAN, R., PUGH, S., DAVDA, C. **Comparison of the MSR/V 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., et al. **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

PELCZAR, M.J; et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo, SP: Makron, c1996-1997. 2 v

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

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

SANTOS LR, NASCIMENTO VP, FLORES ML. ***Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfexões alimentares, ocorridas em 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul.** *Hig Aliment.* 2002;16(102/103):93-9

SOUZA, E.R; et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia: UFG, 2005-. 2006.2v

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

SOARES, ANTONIO G, et al. **Boas práticas de manipulação em bancos de alimentos.** Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro (RJ) v.1, p. 14-15, 2006.

Disponível em : http://mds.gov.br/backup/programas/seguranca-alimentar-e-nutricional-san/bancoalimentos/doc_74__boas_praticas_de_manipulacao_em_bancos_de_alimentos.pdf.

Acesso em 23 de julho 2012