



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

*Faculdade de Engenharia
de Alimentos*

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS LABORATORIAIS:
AVALIAÇÃO DO SISTEMA BAX[®] DE ANÁLISE DE
Salmonella sp EM ALIMENTOS POR REAÇÃO DE
POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

Marta Mitsui Kushida, MSc
Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

K968v Kushida, Marta Mitsui
Validação de métodos laboratoriais: avaliação do sistema
Bax® de análise de *Salmonella* sp em alimentos por reação de
polimerase em cadeia (PCR) / Marta Mitsui Kushida. --
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Salmonella*. 2. Validação de método. 3. Alimentos. I.
Durrant, Lúcia Regina. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Laboratorial method validation: evaluation of BAX system™ for
Salmonella sp in food for polymerase chain reaction

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Salmonella*, Method Validation, Food

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lúcia Regina Durrant

Neusely da Silva

José Luiz Pereira

Ingrid Schmidt-Hebbel

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Fumio Yokoya

MARTA MITSUI KUSHIDA

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS LABORATORIAIS:
AVALIAÇÃO DO SISTEMA BAX® DE ANÁLISE DE *Salmonella* sp EM ALIMENTOS POR
REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos, UNICAMP, para obtenção do
título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
LSFM – UNICAMP
(Orientadora)

Dra. Neusely da Silva
MICROBIOLOGIA – ITAL
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
MICROBIOLOGIA – UNICAMP
(Membro)

Prof. Dra. Ingrid Schmidt-Hebbel
COORDENADORA – SENAC SP
(Membro)

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira
MICROBIOLOGIA – ITAL
(Membro)

Prof. Dr. Fumyo Yokoya
LSFM – UNICAMP
(Membro)

[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...] Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que éramos (Martin Luther King).

DEPENDE DE NÓS
(Ivan Lins – Vitor Martins)

Depende de nós
Quem já foi ou ainda é criança
Que acredita ou tem esperança
Quem faz tudo pr'um mundo melhor

Depende de nós
Que o circo esteja armado
Que o palhaço esteja engraçado
Que o riso esteja no ar
Sem que a gente precise sonhar

Depende de nós
Que os ventos cantem os galhos
Que as folhas bebam orvalho
Que o sol descortine mais as manhãs

Depende de nós
Se este mundo ainda tem jeito
Apesar do que o homem tem feito
Se a vida sobreviverá

Depende de nós
Quem já foi ou ainda é criança
Que acredita ou tem esperança
Quem faz tudo pr'um mundo melhor

“Quem quer, apesar das dificuldades, faz acontecer!”

À Lucas Ken Hiti Kushida e Fernanda Mayumi Kushida, as duas verdadeiras
razões de minha presença aqui.

À Mitsui de Almeida (in memorium), mãe e batalhadora, exemplo de dedicação.

AGRADECIMENTOS

A **Fapesp** pelo auxílio ao projeto.

A **Capex** e **CNPq** pelo auxílio financeiro.

À **Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant**, pelo carinho, força, amizade e principalmente compreensão pelas minhas jornadas pela vida.

À **Dra. Neusely da Silva** pela amizade, participação, auxílio e permissão de realizar este trabalho junto à equipe do ITAL.

A toda equipe do **Laboratório de Microbiologia do ITAL**, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, participação e aprendizado no processo de implantação do sistema de qualidade. Em especial ao carinho e orientações de Dionir Jeremias Batista. Às técnicas Miriam Gonçalves Marquezini e Rosana dos Santos. Às amigas de jornada Ivone Francisca da Silva, Heloisa Litholdo Hervatin, Margarete Midori Okasaki, Thaís Belo Anacleto dos Santos, Dariadne Christina Ivan da Silva, Juliano Luiz de Souza, Sílvia Gouveia Carvalho da Silva, Sílvia Andreia Morelli, Lidiane Botelho, Gabriela Cristina Moita da Silva, Cláudia Galusni Pagoto e Sandra Coury Steinschorn. À Dra Neliane Ferraz de Arruda Silveira e Dra. Maria Fernanda P. M. de Castro. Meus sinceros agradecimentos a todos.

À **Madasa do Brasil**, representante oficial da Dupont/Qualicon no país, especialmente a Dra. Nara Zucatto, médica veterinária, pelas informações e auxílios durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **LARA de Campinas** (Laboratório de Análises de Referência Animal) especialmente ao Dr. Amauri pela cessão de amostras de produtos cárneos e cepas de *Salmonella*.

À **Dra. Ingrid Schmidt-Hebbel** pelo grau de confiança em vários momentos de minha vida e principalmente a amizade que tornou-se sólida.

Ao amigo tão especial **Alessandro Danielli Nicola**, pela participação em todos os momentos de desenvolvimento pessoal e criatividade.

À Engenheira de Alimentos **Eliane Maria Ferrarezzo** que me deu a força e a amizade no momento em que mais precisei.

À **Célia Aparecida Domingues**, psicóloga e colega, pelas conversas a respeito de motivação e treinamento de pessoal no processo de implantação de qualidade total.

Ao Geraldo, a Cleusa e todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pelo auxílio e carinho que tem dedicado desde os anos de minha graduação.

Aos funcionários do setor de informática pela presteza com que me ajudaram em meus inúmeros pedidos de socorro.

À minha família, pela paciência e compreensão em meus momentos de ausência.

A todos aqueles que fizeram e fazem parte de minha existência e que por questões de espaço não pude aqui enumerá-los.

E principalmente a **DEUS** por tudo dar tão certo em minha vida!

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Pág.
Sumário.....	xiii
Lista de Quadros.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de figuras.....	xx
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiii
Introdução e justificativa.....	xxv
Objetivos.....	xxvii
Capítulo 1: <i>Salmonella</i>: Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Introdução.....	3
1.2. Sorologia e Patogênese.....	8
1.3. Fatores de virulência.....	13
1.3.1. Antígenos de superfície.....	15
1.3.2. Poder invasivo.....	16
1.3.3. Produção de enterotoxinas e citotoxinas.....	18
1.3.4. Presença de plasmídeos.....	20
1.4. Os diferentes sorotipos mais envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)	22
1.4.1. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorótipo Typhi (<i>S. Typhi</i>)...	22
1.4.2. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorótipo Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i>).....	23
1.4.3. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorótipo Enteritidis (<i>S. Enteritidis</i>).....	23
1.4.4. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorótipo Dublin (<i>S. Dublin</i>).....	24
1.4.5. <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorótipo Choleraesuis (<i>S. Choleraesuis</i>).....	26

1.5. Alimentos envolvidos com a transmissão de <i>Salmonella</i>	26
1.6. Ocorrência no Brasil e no mundo (1995 a 2005).....	28
Capítulo 2: Métodos de detecção de <i>Salmonella</i> em alimentos.....	31
2.1. Método cultural tradicional.....	33
2.2. Métodos alternativos de análise de <i>Salmonella</i> em alimentos.....	40
2.2.1. Métodos imunológicos.....	41
2.2.2. Métodos moleculares baseados nos ácidos nucléicos.....	41
2.2.2.1. Sondas genéticas.....	41
2.2.2.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	42
2.3. Método A-BAX System®.....	44
2.4. Comparativo entre os diferentes métodos.....	52
2.5. Impacto que os métodos rápidos exercem sobre a saúde pública e economia no país.....	55
Capítulo 3: O processo de validação de métodos microbiológicos.....	59
3.1. Questões de qualidade em laboratórios de análises de alimentos.....	61
3.2. Sistemas da qualidade para laboratórios de análises.....	63
3.2.1. Boas Práticas Laboratoriais (BPL).....	64
3.2.2. ISO/IEC 17025:2001.....	65
3.3. Processo de implantação da ISO/IEC 17025:2001.....	69
3.3.1. Estrutura hierárquica dentro do credenciamento	69
3.3.2. Processo para o credenciamento.....	71
3.4. Importância da validação de novos métodos na qualidade das análises laboratoriais.....	73
3.5. Protocolos de validação de métodos de análise.....	77
3.5.1. Protocolo de validação AOAC.....	77
3.5.1.1. Official Methods of Analysis (OMA).....	78
3.5.1.1.1. Teste de robustez (Ruggedness testing).....	79
3.5.1.1.2. Estudo pré-colaborativo.....	79

3.5.1.1.3. Estudo colaborativo.....	79
3.5.1.1.4. Primeira ação de oficialização.....	80
3.5.1.1.5. Oficialização final.....	81
3.5.1.2. Peer-Verified Methods (PVM).....	81
3.5.1.3. Performance Tested Methods (PTM).....	82
3.5.2. Indicadores de desempenho utilizados nos programas de validação da AOAC	83
3.5.2.1. Precisão relativa.....	84
3.5.2.2. Taxa de falsos positivos (pf+).....	84
3.5.2.3. Taxa de falsos negativos (pf-).....	84
3.5.2.4. Sensibilidade (p+).....	84
3.5.2.5. Especificidade (p-).....	84
3.5.2.6. Inclusividade.....	85
3.5.2.7. Exclusividade.....	85
3.5.3. Protocolo de validação ISO 16140.....	85
3.5.3.1. Estudo comparativo entre os métodos.....	86
3.5.3.2. Estudo interlaboratorial.....	87
3.5.4. Indicadores de desempenho utilizados nos programas de validação da ISO 16140	87
3.5.4.1. Precisão relativa.....	87
3.5.4.2. Desvio positivo ou taxa de falsos positivos.....	87
3.5.4.3. Desvio negativo ou taxa de falsos negativos.....	88
3.5.4.4. Sensibilidade relativa.....	88
3.5.4.5. Especificidade relativa.....	88
3.5.4.6. Nível de detecção relativa.....	88
3.5.4.7. Inclusividade e Exclusividade.....	88
3.6. Resultados de comparações e validações do Sistema A-Bax® realizados no Brasil e no exterior.....	89
3.6.1. Resultados da validação do BAX® pela AOAC.....	89
3.6.2. Resultados de trabalhos colaborativos de validação do BAX®.....	89
3.6.3. Comentários finais sobre a validação do BAX® no Brasil.....	91

Capítulo 4: Validação do Sistema BAX® na detecção de <i>Salmonella</i> em alimentos consumidos no Brasil.....	93
4.1. Material e método.....	95
4.1.1. Amostragem.....	95
4.1.2. Método de referência.....	95
4.1.3. Método de análise pelo sistema BAX®.....	95
4.1.4. Inoculação artificial das amostras.....	99
4.1.5. Indicadores de desempenho	100
4.1.5.1. Sensibilidade.....	101
4.1.5.2. Especificidade.....	101
4.1.5.3. Taxa de falsos negativos.....	101
4.1.5.4. Taxa de falsos positivos.....	101
4.1.5.5. Chi Quadrado.....	101
4.1.6. Teste de Inclusividade.....	101
4.1.7. Verificação do limite de detecção do sistema BAX ®.....	102
4.2. Resultados e discussão.....	104
4.2.1. Resultados das análises.....	104
4.2.2. Parâmetros de desempenho.....	104
4.2.3. Resultados discordantes.....	107
4.2.4. Limite de detecção do sistema BAX®.....	109
4.2.5. Resultados do teste de inclusividade	110
4.3. Conclusões.....	110
Referências Bibliográficas.....	113
Anexos.....	135
Anexo 1: Amostras de frutas, produtos de frutas e similares.....	137
Anexo 2: Amostras de hortaliças, legumes, raízes, tubérculos e similares.....	138
Anexo 3: Amostras de cogumelos.....	139
Anexo 4: Amostras de sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não	

	alcoólicas.....	140
Anexo 5:	Amostras de especiarias, temperos, condimentos, molhos preparados e similares.....	141
Anexo 6:	Amostras de açúcar, adoçantes e similares.....	142
Anexo 7:	Amostras de produtos a serem consumidos após adição de líquido com emprego de calor.....	143
Anexo 8:	Amostras de petiscos e similares.....	144
Anexo 9:	Amostras de chocolates, balas, gomas de mascar e produtos de confeitaria.....	145
Anexo 10:	Amostras de refeições prontas para consumo (restaurantes).....	146
Anexo 11:	Amostras de alimentos infantis.....	148
Anexo 12:	Amostras de carne e produtos cárneos.....	149
Anexo 13:	Amostras de pescados e produtos de pesca.....	150
Anexo 14:	Amostras de ovos e derivados.....	151
Anexo 15:	Amostras de leite.....	153
Anexo 16:	Amostras de queijos.....	154
Anexo 17:	Amostras de outros produtos de laticínio.....	155
Anexo 18:	Amostras de bolos, biscoitos, pães e similares.....	156
Anexo 19:	Amostras de amido, fubá, farinhas e massas.....	158
Anexo 20:	Amostras de grãos, sementes e farelos.....	159
Anexo 21:	Amostras de ração animal e ingredientes para formulação de ração.	160
Anexo 22:	Amostras de outros alimentos diversos.....	162
Anexo 23:	Amostras de alimentos contaminados artificialmente.....	163
Anexo 24:	Publicação Diário Oficial da União (D.O.U.) – oficialização do método BAX® de detecção de Salmonella em alimentos.....	165
Anexo 25:	Exemplos de alguns gráficos obtidos durante as análises.....	166

LISTA DE QUADROS

	Pág
Quadro 1: Características de crescimento e controle de <i>S. typhi</i>	25
Quadro 2: Modelo experimental da febre tifóide: relação entre o inóculo ingerido, taxa de manifestação clínica e período de incubação (Hornick et al., 1970, in: Levine et al., 2001).....	27
Quadro 3: Características das colônias de <i>Salmonella</i> na fase de plaqueamento diferencial (SILVA et al., 2001; fotos: Marta Kushida, 2004).....	36
Quadro 4: Características das cepas de <i>Salmonella</i> na fase de confirmação preliminar (SILVA et al., 2001; fotos: Marta Kushida, 2004).....	37
Quadro 5: Características das cepas de <i>Salmonella</i> em alguns testes da fase de provas bioquímicas (SILVA et al., 2001; fotos: Neusely da Silva, 2003; Marta Kushida, 2004).....	38
Quadro 6: Etapas da análise de <i>Salmonella</i> pelo método tradicional (FDA, 1998; fotos: Marta Kushida, 2004).....	39
Quadro 7: Equipamentos e acessórios: A – BAX System® (créditos: fotos:Marta Kushida, 2004; Dupont/Qualicon, 2003).....	47
Quadro 8: Etapas da análise: A – BAX System® (créditos: fotos:Marta Kushida, 2004; Dupont/Qualicon, 2003).....	48
Quadro 9: Resultados da análise: A – BAX System® (créditos: fotos:Marta Kushida, 2004; Dupont/Qualicon, 2003).....	51
Quadro10: Perfil da Curva de fusão para <i>Salmonella</i> (créditos: fotos: Dupont/Qualicon, 2003).....	52
Quadro11: Comparação entre os diferentes métodos de análise de <i>Salmonella</i> em Alimentos.....	54
Quadro12: Dados necessários aos programas de validação da AOAC.....	78
Quadro13: Quadro utilizado para o cálculo dos indicadores de desempenho.....	100

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: Grupos de alimentos e número de amostras analisadas na realização do estudo de validação do sistema Bax®.....	96
Tabela 2: Culturas puras de cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas no teste de inclusividade.....	100
Tabela 3: Comparação dos resultados da análise de <i>Salmonella</i> pelo método de referência e pelo sistema BAX®.....	105
Tabela 4: Parâmetros de desempenho do sistema BAX® de análise de <i>Salmonella</i> , em comparação com o método cultural da FDA....	106
Tabela 5: Comparação dos parâmetros de desempenho do sistema BAX® para <i>Salmonella</i> obtidos em nosso trabalho com os obtidos pelo MAPA e AOAC e os valores recomendados pelo FSIS/USDA.....	107
Tabela 6: Determinação do parâmetro M para resultados discordantes...	108
Tabela 7: Resultado da determinação do limite de detecção do Sistema BAX®.....	109

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: <i>Salmonella</i> sp (crédito: www.instruct.nmu.edu/cls/lriipi/micro/salmonella.jpg).....	4
Figura 2: <i>Salmonella arizonae</i> em meio Ágar Entérico Hektoen (crédito: foto Neusely da Silva, 2003).....	4
Figura 3: O gênero <i>Salmonella</i> . (crédito: fluxograma Marta Kushida, 2005).....	4
Figura 4: Estrutura antigênica de interesse em <i>Salmonella</i> . (crédito: www.bioan.dk/images/Antigen-struktur_2.jpg).....	8
Figura 5: Eventos na patogênese de <i>Salmonella</i> . (crédito: Ohl & Miller, 2001).	12
Figura 6: Gráfico das incidências de Febre Tifóide - Coeficientes de incidência por 100 mil habitantes de casos confirmados autóctones segundo a região, 1990-2004 (crédito: DDTHA/CVE, 2004).....	29
Figura 7: Principais características bioquímicas de <i>Salmonella</i> (crédito: fluxograma Marta Kushida, 2005).....	35
Figura 8: PCR – amplificação (crédito: Dupont/Qualicon, 2003).....	44
Figura 9: Emissão do sinal de fluorescência em presença do DNA genômico (crédito: Dupont/Qualicon, 2003).....	50
Figura 10: Fluxograma do processo de implantação da ISO/IEC 17025 (crédito: http://www.inmetro.gov.br).....	74
Figura 11: Método de referência utilizado na análise de <i>Salmonella</i> pelo método tradicional (FDA 1998).....	96
Figura 12: Método de análise de <i>Salmonella</i> utilizando o sistema BAX®.....	97
Figura 13: Esquema de inoculação e análise de amostras artificialmente contaminadas.....	99
Figura 14 Esquema de análise para determinar o limite de detecção do Sistema BAX® e a capacidade de detectar células mortas.....	103

RESUMO

Salmonella é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em todo o mundo, sendo objeto de preocupação dos principais organismos internacionais relacionados com a saúde pública. A análise deste patógeno faz parte da rotina de qualquer laboratório de controle de qualidade de alimentos e, embora exista uma grande variedade de métodos alternativos, a maioria desses laboratórios ainda utiliza o método cultural tradicional, caro, lento e trabalhoso. A principal barreira à disseminação dos métodos alternativos é o fato de serem presuntivos e, em caso positivo, exigirem o retorno ao método tradicional, para confirmação. Recentemente, entretanto, foi introduzida no Brasil uma técnica que não padece dessa desvantagem, o sistema BAX® de análise de *Salmonella* por reação de polimerase em cadeia (PCR). Além de ser confirmativo, o BAX® ainda é bem mais rápido, permitindo a obtenção dos resultados em 30h e com o mínimo de manipulação, pois é totalmente automatizado. A substituição do método tradicional pelo BAX® pode elevar significativamente a capacidade de análise dos laboratórios, porém, é um sistema novo, ainda pouco utilizado no país, sendo importante uma avaliação do seu desempenho na análise de produtos brasileiros, objetivo do presente trabalho. Para tanto realizou-se uma avaliação do Sistema BAX® em comparação com o método cultural tradicional, analisando 708 amostras de 22 categorias de alimentos em relação à presença de *Salmonella* pelos dois métodos, o que permitiu a determinação dos parâmetros de desempenho do sistema BAX®. Os resultados obtidos indicaram sensibilidade de 100%, especificidade de 98,6%, taxa de falsos positivos de 1,4% e taxa de falsos negativos de 0%.

Palavras chaves: *Salmonella*. Validação de métodos. Alimentos.

ABSTRACT

Salmonella sp is one of most important food born microorganism in all the world, and it always has been focused among international public health organs. The food analysis for this pathogen is a subject of routine in all food quality control laboratories, and, besides there are several alternative methods for *Salmonella* sp detection, but most of the laboratories still work with the traditional technique of detection, which is very expensive and time consuming. The barrier to alternatives methods is the fact that most of them are considered presumptive, and need the traditional technique to confirm the positives results. An alternative technique that does not present the step of confirmation was recently, introduced in Brazil, the BAX™ System for *Salmonella* sp, which works by polymerase chain reaction (PCR). It is a very quick detection method, safety, accurate which shows the analysis result in 30 hours, utilizing very few manipulation of samples, since is automatized. The substitution of traditional *Salmonella* sp detection method for BAX™ system, can increase significantly the laboratories analysis capacity, but as it is a very new technique, is still unknown in our country. In despite of this, it is important to evaluate its performance in Brazilian food products, which is the aim of this research. A evaluation of BAX™ system, compared with the *Salmonella* traditional method was then carried out, using 708 samples of 22 different food categories. The results showed sensibility of 100%, specificity of 98,6%, false-positives ratio of 1,4% and false-negatives ratio of 0% for BAX™ system.

Keywords: *Salmonella*. Method validation. Food.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Salmonella é um patógeno intracelular facultativo, que pode causar doenças como gastroenterites ou febre entérica, sendo a forma de contágio normalmente relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados (MARCUS et al., 2000).

É o principal agente de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Brasil, tendo respondido por 21% do total de casos relatados e 76% dos surtos provocados por bactérias, no período de 1995 a 1999 (CVE/SP, 2001). Também nos países desenvolvidos ocupa o primeiro lugar, só nos Estados Unidos respondendo por 54,5% dos surtos e 46,4% das mortes provocadas por bactérias, no período de 1993 a 1997 (OLSEN et al., 2000). De acordo com a mesma fonte, uma grande proporção dos surtos nesse país é de origem desconhecida (48,5%) ou associada a mais de um alimento (17%), porém, os demais são relacionados aos produtos cárneos (10%), frutas, vegetais e saladas (9%), sorvetes e produtos de confeitaria (6,4%), ovos (4,8%) e outros (4,3%). Dentre os produtos cárneos, os mais freqüentemente envolvidos são a carne bovina e a carne de aves (frango e peru), com 38 e 32% dos casos, respectivamente. No Brasil não há dados sistemáticos que possam estabelecer a origem das doenças, porém, há um esforço do governo federal e do Estado de São Paulo em estabelecer um programa de vigilância epidemiológica efetivo, integrado aos objetivos da FAO (Food and Agriculture Organization), OMS (Organização Mundial de Saúde), OPAS (Organização Panamericana de Saúde) e Codex Alimentarius.

A análise de *Salmonella* faz parte da rotina dos laboratórios públicos e privados que monitoram a qualidade de alimentos, sendo exigida pela legislação brasileira para a maior parte dos produtos disponíveis no mercado (BRASIL, 2001). A metodologia utilizada pela maioria desses laboratórios ainda é a técnica cultural tradicional, envolvendo várias etapas de subcultura para recuperar as

células injuriadas, elevar seletivamente a população, diferenciar *Salmonella* da microbiota acompanhante e confirmar a identidade das culturas isoladas.

O método tradicional é bastante sensível, com limite de detecção de uma unidade formadora de colônia/25g de amostra, porém, é trabalhoso e lento, o que limita a capacidade de análise dos laboratórios. A etapa mais cara, mais trabalhosa e mais demorada é a confirmação, porque envolve a caracterização sorológica e bioquímica de várias colônias, isoladas das placas de meios seletivos diferenciais. Em função disso, há um grande interesse por métodos alternativos rápidos e simples, que não exijam uma etapa de provas bioquímicas para confirmação.

Com o advento da globalização e conseqüentemente o aumento nas exportações e importações de alimentos, sempre seguindo a política da Qualidade Total, novos métodos de análise alternativos que efetivamente minimizem o tempo necessário na identificação de microrganismos patogênicos responsáveis por DTAs sempre serão bem vindos, desde que comprovada sua eficiência e eficácia.

Hoje dispomos de diversos métodos alternativos, sendo que nos últimos dez anos houve um grande avanço no desenvolvimento de novos métodos, particularmente os imunológicos e, em menor escala, os métodos baseados em genética molecular.

Esse é o caso do sistema BAX®, baseado na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). O procedimento é totalmente automatizado e todos os reagentes são comercializados na forma de tabletes, incluídos em um “kit” completo que dispensa qualquer etapa de preparação. O tempo de análise é de aproximadamente 30 horas, podendo ser analisadas 96 amostras simultaneamente (ANDREWS et al., 2001).

Os estudos de avaliação realizados até o momento são extremamente promissores, porém, poucos foram realizados no Brasil, objetivo do presente trabalho. O processo de validação deste sistema é um dos aspectos importantes para a garantia da qualidade das análises de laboratórios credenciados.

OBJETIVOS:

1. Avaliação da incidência de *Salmonella* em amostras de alimentos.
2. Validação do Sistema BAX® na detecção de *Salmonella* em alimentos consumidos no Brasil, de acordo com os critérios da Association of Analytical Chemists (AOAC).

CAPÍTULO 1:

Salmonella:

Revisão Bibliográfica

1. *Salmonella*: Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução:

A família *Enterobacteriaceae* consiste em um importante grupo de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal, incluindo dentre muitos outros gêneros, *Shigella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Salmonella*.

De acordo com o Manual de Bergey (BRENNER, 1984), *Salmonella* é classificada como um bastonete Gram negativo, anaeróbica facultativa, não esporulada, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tribo *Salmonelleae* estando, portanto estritamente relacionada com *Escherichia coli*. Podem ser diferenciadas de outras enterobactérias e dentro do mesmo gênero com base em reações bioquímicas, meios diferenciais e sorologia. Uma representação desta bactéria pode ser vista na figura 1. Apresenta motilidade através de flagelo peritricóico, porém com algumas espécies não móteis, tais como *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*. A maioria reduz nitrato a nitrito e produz gás a partir da fermentação de glucose. Em placas de Petri contendo meio nutritivo costumam apresentar colônias com cerca de 2 a 4 mm de diâmetro, tal como mostrado na figura 2.

A classificação da bactéria em gênero, espécie e subespécie é determinada pelos critérios relacionados com o método cultural clássico e testes bioquímicos. A divisão em sorogrupo é determinada por reações de aglutinação antígeno/anticorpo. O sorotipo é determinado através de análises que envolvem fagotipo, REP-PCR (Repetitive extragenic Palindromic Sequence PCR), Ribotipagem, PFGE (Pulsed Field Gel Eletroforese).

Através de estudos de DNA sabe-se hoje que o gênero *Salmonella* compreende duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a primeira encontra-se, por sua vez, subdividida em seis subespécies de acordo com o esquema da figura 3 (TERRAGNO et al., 2003).

Até 1989 *Salmonella bongori* era considerada uma subespécie (V), sendo denominada *S. choleraesuis* subespécie *bongori*, passando, através de pesquisa desenvolvida por REEVES e colaboradores (1989) pelo método de eletroforese multienzimática, a ser classificada como espécie dentro do gênero *Salmonella*.

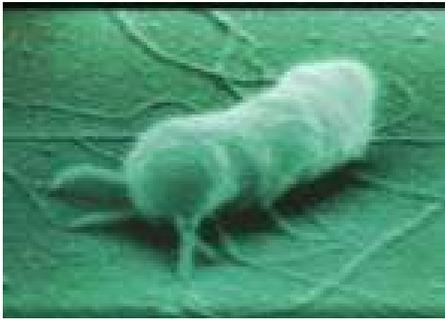


Figura 1: *Salmonella* sp

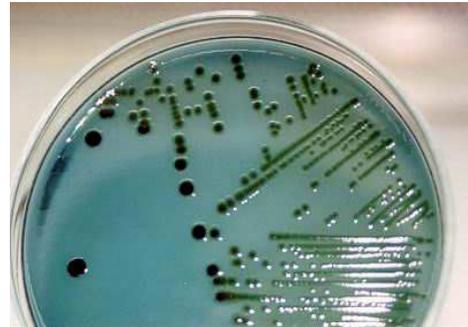


Figura 2: *Salmonella* Arizonae em meio Ágar Entérico Hektoen (HE).

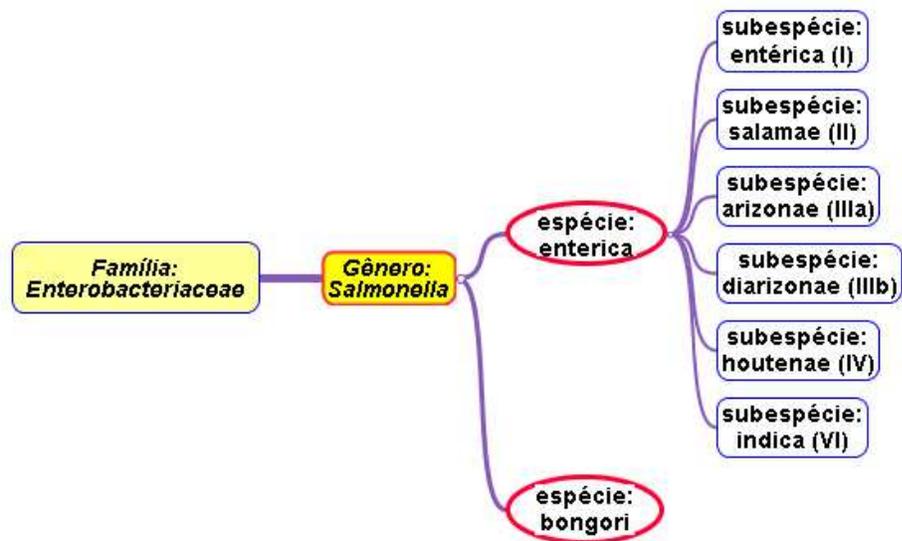


Figura 3: O gênero *Salmonella*.

Dentro desta classificação, cada uma das subespécies de *S. enterica* e a espécie *S. bongori* divide-se em cerca de 2501 sorotipos assim classificadas de acordo com seus fatores antigênicos. Destas, cerca de 1478 pertencem à espécie *enterica*, subespécie *enterica* (subespécie I), a maioria isoladas do ser humano e de animais de sangue quente. Os demais sorotipos pertencem às subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI e a espécie *bongori*, isolados principalmente de animais de sangue frio e do meio ambiente (SOLARI et al., 2003). Cada um desses sorotipos faz parte de um sorogrupo, A, B, C1, C2, D e E, os quais são determinados através de reações de aglutinação sobre o antígeno “O” (LPS). Variações entre as diferentes estruturas do antígeno “O” estão relacionadas com o tipo de açúcar presente ou no arranjo dos mesmos. Esta variação é que promove a base para a sorotipagem da *Salmonella* em sorogrupos (GILLESPIE et al., s.d.).

Exemplos:

- Sorogrupo A = *S. Paratyphi* A;
- Sorogrupo B = *S. Paratyphi* B, *S. Typhimurium*;
- Sorogrupo C1 = *S. Paratyphi* C, *S. Choleraesuis*;
- Sorogrupo D = *S. Typhi*, *Dublin* e *S. Enteritidis*

Na nomenclatura utilizada para descrever os diversos sorotipos de *Salmonella*, um grande número de trabalhos têm reportado erroneamente o nome do sorotipo grafado em itálico. Isto sugere a existência de diferentes espécies e como foi visto, existem apenas duas. Portanto a forma correta é a escrita do sorotipo na forma cursiva normal. Um exemplo: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhi ou simplesmente *Salmonella* Typhi (ANDERSON & ZIPPRIN, 2001).

Recentemente pesquisadores brasileiros descreveram uma nova variante sorológica de *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae*, isolada de cobras (*Crotalus durissus*) (SOLARI et al., 2003). Também foi relatada a existência de um novo sorotipo de *Salmonella* isolado de pequenos crustáceos (*Phocoena*

phocoena) no Reino Unido através de técnicas moleculares (CRICHTON et al., 2000). Muitas das razões para a existência de tantos sorotipos diferentes, devem-se ao grau de resistência que as cepas desenvolvem em relação às várias drogas utilizadas para sua erradicação e a própria evolução da espécie.

Quanto à patogenicidade destas bactérias, observamos que as cepas que apresentam maiores problemas de saúde pública são diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, sendo que os principais são *S. enterica* sorotipo Typhi, *S. enterica* sorotipo Typhimurium, *S. enterica* sorotipo Enteritidis.

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA, 1988) as diversas espécies de *Salmonella* encontram-se largamente distribuída por vários *habitats*, entre eles a água, solo, superfícies diversas, fezes, trato gastrointestinal de homens e animais e alimentos em geral.

Em razão de *Salmonella* causar infecções sistêmicas ou entéricas em homens e animais, torna-a um importante patógeno e mesmo com toda a implantação de sistemas de higiene na produção de alimentos, ela permanece como um dos mais importantes agentes patogênicos transmitidos via alimento.

As manifestações da doença podem variar de acordo com o sorotipo e hospedeiro. Desta forma, certos sorotipos adaptados a um hospedeiro causam doença quase que exclusivamente em seu hospedeiro específico (ser humano ou animal), enquanto outros sorotipos apresentam uma larga faixa de especificidade (ANDERSON & ZIPRIN, 2001).

Dentro das numerosas subespécies no mundo, a que tem tido maior destaque em casos de doenças em seres humanos é *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. É transmitida principalmente por alimentos, ocupando a segunda posição nos isolados em homens (HUMPREY, T., 2000, apud: KICH, 2004), perdendo somente para *Salmonella* Enteritidis (FDA/CFSSAN, 2001). A bactéria é altamente contagiosa, e a principal forma de transmissão é a via fecal – oral. Desta forma, um intensivo controle de qualidade tem buscado minimizar problemas deste tipo através das Boas Práticas de Fabricação.

Os maiores registros de casos ainda permanecem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que em países desenvolvidos tem-se atingido grau satisfatório de controle. No entanto tem-se detectado espécies resistentes a muitos antibióticos, denominadas de MDR (“Multi Drug Resistant”) (RABSCH et al., 2001; DAVIES et al., 1999).

Uma explicação atribuída por DAVIES et al. (1999) para a resistência a múltiplas drogas tem sido quanto à utilização de antimicrobianos em fazendas. A partir daí as cepas resistentes passam a contaminar o ser humano, porém, no entanto, ainda há controvérsias. Estes autores compararam os caminhos da resistência de *Salmonella* Typhimurium durante 15 anos, avaliando sua relação com o uso de antimicrobianos. Uma das conclusões a que chegaram foi de que as cepas isoladas em várias partes do mundo eram clones de uma única cepa, descartando a hipótese de que a resistência poderia ter sido adquirida de outras cepas indígenas de cada região estudada. Outra conclusão está relacionada à forma como a resistência foi adquirida, não devendo ser atribuída unicamente ao uso de antimicrobianos em fazendas, mas também adquirida no ser humano, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, com a disseminação pelo mundo através da movimentação de pessoas e comércio de animais.

A legislação brasileira segue as normas internacionais, sendo rigorosa neste sentido, não havendo tolerância quanto à presença desta bactéria em alimentos. Para as análises recomenda-se plano de amostragem de 2 classes, estabelecendo ausência de *Salmonella* em 25 g de cada unidade de amostra (ANVISA, 2001). No caso da presença, o produto é considerado impróprio para o consumo e potencialmente capaz de causar enfermidade.

O ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) e o Codex Alimentarius classificam a salmonelose como categoria 2, ou seja, risco direto à saúde, de difusão limitada apenas às pessoas que ingeriram o alimento/água.

1.2. Sorologia e Patogênese.

Salmonella é uma das bactérias mais intensivamente estudada, e muito já foi esclarecido, em nível molecular, a respeito de sua interação com o hospedeiro (PARKER & GUARD-PETTER, 2001; KOWARZ, 1994; PARKILL et al., 2001). Entretanto muitas questões ainda se encontram em aberto.

Diferentes espécies de *Salmonella* estão relatadas na literatura científica, sendo, as patogênicas ao homem responsáveis por quadros clínicos como febre entérica, gastroenterite e septicemia (CVE/SP, 2001; FDA/CFSAN, 1992; VAILLANT et al., 1996; .KAKU et al, 1995; PANICO et al, 1999).

Somente as bactérias que possuem vários fatores de virulência apresentam a capacidade patogênica. A distinção entre as diversas cepas de *Salmonella* deve-se a estrutura antigênica característica de cada sorótipo, sendo três os principais antígenos de interesse no diagnóstico: o antígeno O (somático), o antígeno H (flagelar) e o antígeno Vi (capsular) (CVE/SP, 2001), os quais serão melhor descritos no item 1.3 (figura 4).

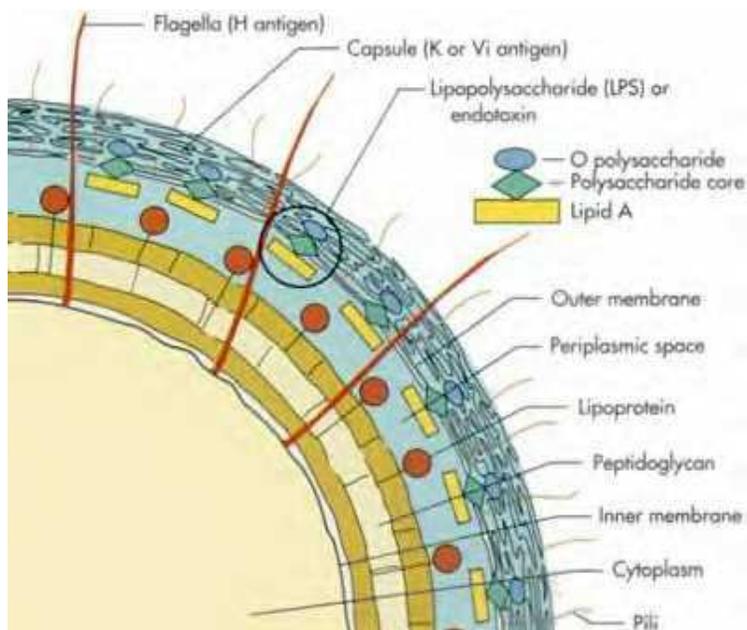


Figura 4: Estrutura antigênica de interesse em *Salmonella*.

Entre os diversos sorovares conhecidos podemos citar: *Salmonella* Dublín, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Cholerasuis, *Salmonella* Paratyphi A, B e C, *Salmonella* Arizonae, *Salmonella* Sendai, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum.

Algumas destas cepas apresentam características particulares, tais como *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum que são imóveis, e *Salmonella* Typhi, que não produz gás durante a fermentação de açúcares. Destas, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A e C e *Salmonella* Sendai são exclusivamente patógenas ao homem (CVE/SP, 2001, LEVINE, 2001). As principais manifestações clínicas resultantes da contaminação com *Salmonella* são febre entérica e gastroenterite (OHL & MILLER, 2001).

O passo inicial para a maioria das infecções causadas pela interação da *Salmonella* com a mucosa intestinal do hospedeiro é a enterocolite, constituindo a mais comum manifestação de doença causada por esta bactéria (DARWIN & MILLER, 1999), seguindo para uma gastroenterite. O quadro clínico apresenta-se principalmente como toxinfecções alimentares, com náuseas e vômitos, seguidos de diarréia, cefaléia e dor abdominal, sintomas apresentados cerca de 6 a 48 horas após a ingestão do alimento contaminado. A diarréia pode conter sangue, linfócitos e muco. Crianças com menos de um ano e adultos com mais de 60 anos são os mais susceptíveis, apresentando quadros mais graves (DARWIN & MILLER, 1999). Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE/SP, 2001) o período de incubação para *Salmonella* Enteritidis é de 12 a 36 horas após ingestão do alimento contaminado. Na realidade, o período de incubação depende de muitas variáveis relacionadas com o patógeno e com o hospedeiro, tais como o tamanho do inóculo, grau de virulência, interação do microrganismo com o alimento, interações com outros microrganismos, características imunológicas e a susceptibilidade do hospedeiro.

Quando o agente causal é *S. Typhi* ou *S. Paratyphi*, patógenos exclusivamente humanos, o quadro passa a ser denominado febre entérica ou febre tifóide (salmonelose tifoidal), com manifestações clínicas mais graves, como

febre prolongada, bacteremia sem extensão endotelial, ativação do retículo endotelial afetando gânglios mesentéricos, intestino, fígado e baço. O período de incubação é de 7 a 14 dias e os sintomas são: febre inicial baixa, seguida de febre alta (38 a 40 °C), mal estar geral, anorexia, mialgia, boca seca e cefaléia, dor torácica, dor abdominal, diarréia, náuseas, vômitos, e ocasionalmente erupções cutâneas. Sem tratamento a mortalidade pode atingir 10 a 15% (OHL & MILLER, 2001).

A salmonelose não tifoidal têm como característica a manifestação mais rápida, apresentando sintomas entre poucas horas (em torno de 12 horas) a poucos dias, dependendo da dose infectante. Neste caso as manifestações são enterocolite e diarréia e, algumas vezes, infecções sistêmicas (ZIPRIN & HUME, 2001).

A diferença entre os quadros clínicos da gastroenterite e a febre tifóide ou entérica deve-se à forma invasiva do sorótipo diretamente relacionado (figura 5). Na gastroenterite, após atingir o intestino delgado, a bactéria precisa atravessar o muco intestinal, para aderir às células epiteliais intestinais e, em seguida, sofre endocitose (mediado pela liberação de uma série de proteínas ou toxinas). Após atravessar a barreira epitelial, inicia-se a geração de secreção gástrica, recrutamento e transmigração de neutrófilos para o lúmen intestinal e a bactéria, através de fagócitos infectados, pode ser disseminada pelo organismo hospedeiro (septicemia). Em um quadro de defesa normal, estes fagócitos fundem-se com lisossomos, culminando na destruição do invasor, porém ainda não está claro como algumas bactérias patogênicas conseguem modular este processo para sua sobrevivência (MUKHERJEE et al, 2002). No caso de febre entérica ocorre uma invasão via “células M” através de endocitose, também mediado pela bactéria, causando danos a estas células (resultando em ulcerações) para em seguida infectar os macrófagos localizados na submucosa, responsáveis também pela defesa do organismo, porém através de mecanismos de virulência, a bactéria pode sobreviver. Estes macrófagos infectados migram através do sangue e vias

linfáticas para outros órgãos (OHL & MILLER, 2001). Estes mecanismos de virulência serão melhor discutidos no item 1.3.

Existe um interesse entre os pesquisadores em determinar se há correlação entre febre tifóide e carcinoma, já que em alguns casos foram detectados problemas como ulcerações da parede intestinal (em alguns casos com perfurações fatais) e infecção da vesícula biliar. Em alguns casos a infecção evoluiu para osteomelite e envolvimento de órgãos como cérebro e meninges (ZIPRIN & HUME, 2001). Obviamente, estas ocorrências, que culminam com o quadro infeccioso, dependem das condições imunológicas do hospedeiro, sendo os mais susceptíveis neonatos, crianças, idosos e imunodeprimidos, devido à imaturidade ou debilidade do sistema imunológico. Os casos mais graves que culminam com morte estão associados a complicações mais graves, como endocardite e meningite (KICH & CARDOSO, 2004).

Muitas pessoas podem ser portadoras assintomáticas (os chamados portadores crônicos) eliminando de *Salmonella* através das fezes. Esta é a principal forma de transmissão, requerendo atenção especial no caso de manipuladores de alimentos. Este patógeno possui alta infectividade, baixa patogenicidade e alta virulência, o que explica a existência de portadores assintomáticos (fontes de infecção não doentes), que desempenham importante papel na manutenção e disseminação da doença entre a população (DDTHA/CVE, 2004).

As ocorrências de Salmonelose não tifoidal não são tratadas com antibióticos, pois estes podem interferir no curso da doença, inclusive favorecendo o estado posterior de portador assintomático. Não deve ser dado laxante e o tratamento deve ser feito somente com base na reposição hídrica e eletrolítica. O uso de antibióticos fica restrito apenas a crianças menores de um ano e imunodeprimidos, ou quando a infecção torna-se sistêmica. Neste caso utiliza-se Ampicilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Sulfametoxazol – trimetropina, Cloranfenicol, Fluoroquinolonas ou Cefalosporina (CDC, 2005; ZIPRIN & HUME, 2001). Para os casos de salmonelose tifoidal o tratamento com antibióticos

envolve tradicionalmente Cloranfenicol, Ampicilina, Sulfametoxazol – trimetropina e mais recentemente Gentamicina, Fluoroquinolonas e Cefalosporina (ZIPRIN & HUME, 2001).

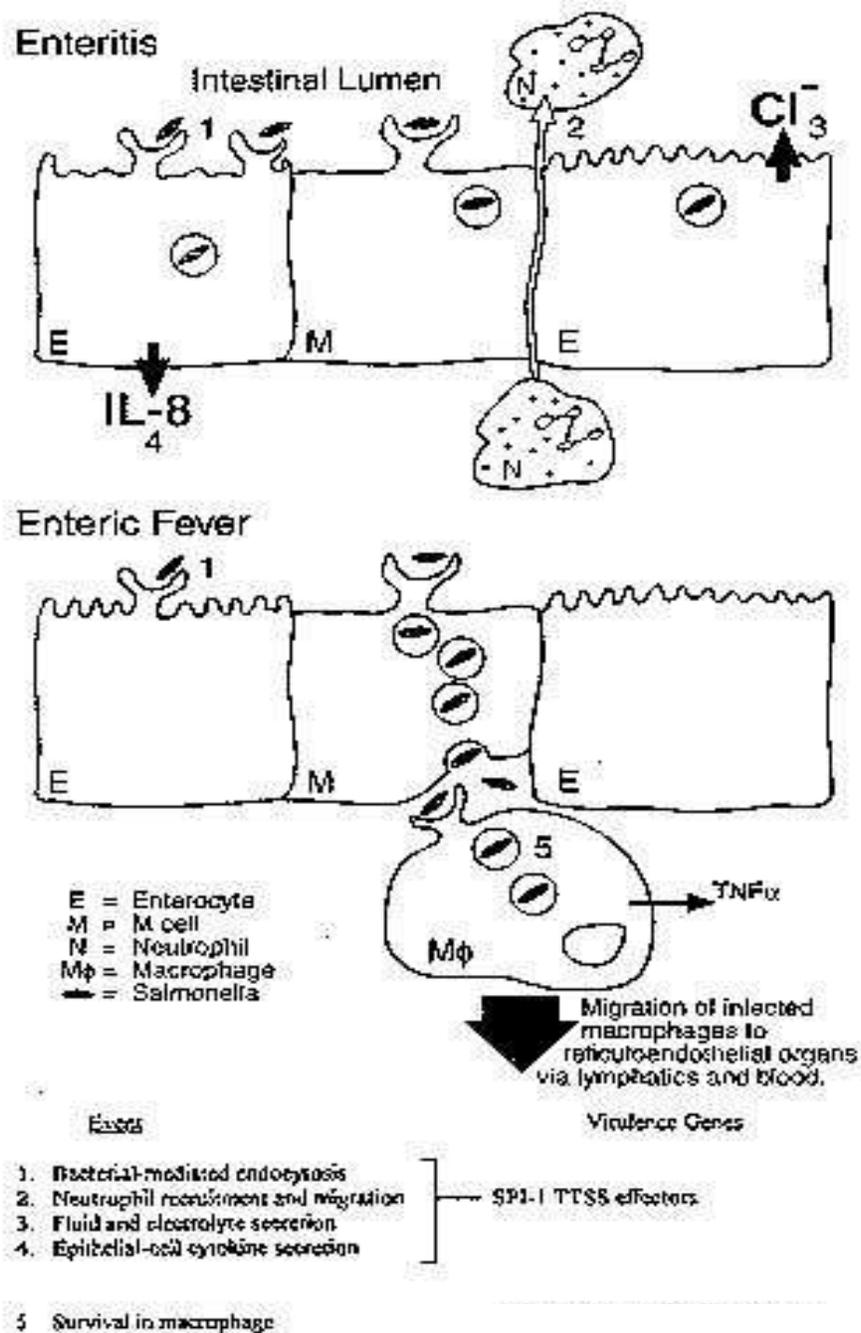


Figura 5: Eventos na patogênese de *Salmonella*.

1.3. Fatores de virulência.

É amplamente relatado na literatura o fato das bactérias entéricas secretarem algum tipo de proteína diretamente relacionada com a virulência das cepas, por interferência nos sinais de transdução ou metabolismo das células hospedeiras.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade da *Salmonella*, uma breve revisão de como funciona nosso sistema de defesa faz-se necessária. Basicamente podemos “separar” nosso sistema imune em dois: um sistema imune inato, que reconhece classes genéricas de moléculas, sistema este conhecido como imunidade natural (ou seja, o primeiro sistema de defesa) e um sistema imune adaptativo, que reconhece moléculas que entram em contato com nosso sistema, conhecido como imunidade específica (ou seja, possui memória imunológica) (MEDZHITOV, 2001; AKIRA & TAKEDA, 2004). É através do sistema inato que se tem a resposta inflamatória inicial (sintomas como febre, dor de cabeça, etc.). Hoje já se sabe que para as células de defesa B e T do sistema adaptativo serem ativadas é necessário um sinal do sistema inato, através de proteínas sinalizadoras, ou citocinas, que também induzem a inflamação. Dentro do sistema imune inato tem-se as células dendríticas, macrófagos e neutrófilos para a defesa do organismo humano. O LPS ou lipopolissacarídeo produzido por diversas bactérias Gram negativas, entre elas a *Salmonella*, é um dos indutores da produção de citocinas, que por sua vez é liberada através do sinal dos TLRs (“Toll-Like Receptor”), que são receptores presentes nas membranas das células de defesa do sistema imune inato (YANG et al., 1998; O’NEILL, 2005). Os TLRs se ligam e reconhecem indutores específicos presentes nas bactérias e induzem as células a liberarem as citocinas, que induzem a aproximação de mais células de defesa, como células dendríticas e macrófagos, atacando as células invasoras, desencadeando a sintomatologia clássica inflamatória. Ao mesmo tempo esse sistema ativa a resposta imune adaptativa, ou seja, as células B e T reconhecem as citocinas produzidas, além de reconhecer antígenos das bactérias invasoras, produzindo a resposta imune que fica

armazenada na “memória” destas células (O’NEILL, 2005). Apesar dos dois tipos de mecanismos já serem conhecidos há décadas, o conhecimento desta interação entre os sistemas de defesa é bem recente (BEUTLER, 2004). Dependendo do sistema imune da pessoa infectada, que pode estar debilitado por algum motivo (idade, doenças imunodepressoras) ou imaturo (crianças de 0 a 6 anos), os patógenos podem explorar uma forma de efetivamente invadir o ser humano e desencadear um quadro mais sério da doença.

Quando ocorre a invasão da *Salmonella* no organismo humano, ambos os sistemas de defesa estão desencadeando a produção de uma série de substâncias, ou “mecanismos de defesa” um contra o outro, vencendo quem melhor estiver preparado.

Salmonella apresenta vários mecanismos que resultam em sua patogenicidade, também denominados fatores de virulência, dentre os quais podem ser citados os antígenos de superfície, poder invasivo, produção de enterotoxinas e citotoxinas e presença de plasmídeos que conferem virulência (GOOSNEY et al., 1999; FIERER et al., 1993, VALDEZ et al., 2004). A maioria das bactérias patogênicas apresenta de vários desses fatores (MARCUS et al., 2000).

A relação entre virulência e imunidade do hospedeiro está diretamente relacionada. Assim que ocorre o contato do patógeno com a mucosa intestinal, o sistema de defesa começa a produzir anticorpos (IgA, IgG e anti-LPS), prevenindo a adesão bacteriana. Iankov e colegas (2004) estudaram o papel do anticorpo IgA contra o antígeno “O” da *Salmonella* do grupo entérico. Os anticorpos IgA específicos para antígenos flagelares podem proteger o organismo através de imobilização das bactérias que apresentam motilidade, porém o mecanismo ainda não está bem esclarecido. Concluíram que “in vivo” IgA, em presença de outros fatores não imunes, pode ser efetivo contra o ataque por *Salmonella*, sugerindo que, através da complexidade do sistema imune, possam ser avaliadas as possibilidades de utilização de vacinas para uma pré-imunização do hospedeiro.

1.3.1. Antígenos de superfície:

Os diversos sorótipos de *Salmonella* não podem ser diferenciados bioquimicamente e, portanto a diferenciação se dá através de seus antígenos somáticos e flagelares. Este procedimento está baseado em reações imunológicas.

- **Antígeno O ou antígeno somático:** LPS (lipopolissacarídeo), presente na parede celular, característico em todas as espécies de *Salmonella*, lembrando que é o antígeno imunodominante da grande maioria das bactérias Gram negativas (URUEÑA, 2003). Possui natureza glicolípídica, identificando-se com a endotoxina O. É termoestável (100 ou 120 °C/2h) e essencial à virulência, já que confere resistência do microrganismo no hospedeiro humano (IANKOV, 2004).

É um ponto de reconhecimento do sistema imune do hospedeiro, desencadeando reações inflamatórias de defesa (FREUDENBERG et al, 2001).

O lipopolissacarídeo é uma molécula anfipática formada por um lipídeo “A” (região hidrofóbica, localizada na parte interna), um núcleo polissacarídeo (formado por glucose, galactose, N-acetilglucosamina, cetodesoxioctonato, outros açúcares com 7 carbonos) e um oligossacarídeo “O” (composto por açúcares com 6 carbonos, como galactose, glucose, ramnose e manose), além de outros açúcares pouco comuns, formando uma seqüência de 4 a 5 unidades, cuja repetição dá a característica do oligossacarídeo “O”, região dominante do ponto de vista antigênico (URUEÑA, 2003). O lipídeo “A” é o centro ativo da molécula do LPS, responsável pelos efeitos tóxicos e outros efeitos biológicos. Sua estrutura é altamente conservada entre bactérias Gram negativas, especialmente entre as *Enterobacteriaceae* (FREUDENBERG et al, 2001). De acordo com estudos descritos por estes autores, quando LPS é isolado e purificado é responsável por uma série de reações características de infecções por bactérias Gram negativas em animais e humanos voluntários, tais como febre, dor de cabeça, náusea,

diarréia, alterações na contagem de leucócitos e trombócitos, podendo levar à morte.

- **Antígeno H ou antígeno flagelar:** presente na estrutura flagelar, de natureza protéica, a composição e ordem dos aminoácidos da proteína flagelina (uma subunidade do filamento helicoidal que forma o flagelo) determinam a especificidade flagelar (fatores antigênicos do grupo H), sendo termolábil (não resistem à temperatura de 100 °C/1 h) e ocorre em poucos sorótipos (CVE/SP, 2001).

- **Antígeno Vi ou antígeno de virulência:** presente na estrutura capsular, formado por um complexo glicidoprotéico. Ocorre em apenas três sorotipos. É termolábil, sendo que a *S. typhi* possui o antígeno Vi, importante para sua caracterização. Também pode ser encontrado na *S. paratyphi* e algumas cepas de *S. Dublin*. Assim como o antígeno “O”, também confere resistência ao microrganismo no hospedeiro humano, em especial à fagocitose (IANKOV, 2004).

Nas análises laboratoriais os anticorpos aglutinadores específicos são, respectivamente, anti-O, anti-H e anti Vi. Encontram-se disponíveis no mercado soros polivalentes anti-salmonela, que contém os anticorpos específicos, possibilitando a identificação da maioria das amostras de *Salmonella* isoladas comumente de seres humanos e animais.

1.3.2. Poder invasivo:

Os patógenos podem aderir à membrana externa da célula hospedeira e mediar os efeitos patogênicos extracelularmente ou invadir a célula e desenvolver mecanismos de sobrevivência intracelularmente. Para a invasão da célula hospedeira o patógeno utiliza-se de alterações no citoesqueleto (estrutura

responsável por manter uma estrutura flexível das células). A *Salmonella* antes da invasão promove alterações na estrutura celular explorando o citoesqueleto hospedeiro e uma vez no interior, o citoesqueleto retoma sua forma inicial (GOOSNEY, 1999).

Grande parte do mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* é explicado pela invasão da mucosa intestinal, com surgimento de reação inflamatória intensa (CFSAN/FDA, 1992). Após a ingestão do alimento contaminado, a bactéria segue por uma série de barreiras naturais, como a acidez estomacal, para em seguida, atingir um ambiente alcalino mais brando no intestino delgado, onde precisa atravessar a mucosa intestinal para em seguida aderir às células epiteliais intestinais, provocando o quadro clínico. Este fato tem sido demonstrado “in vitro”, mostrando que a alteração do pH no meio de cultura favorece a invasão celular, segundo DAEFLER (1999). Além disto, deve também competir com a flora normal do trato gastrointestinal.

A invasão da mucosa intestinal pode ser explicada inicialmente pela invasão através das “células M” e em parte pela presença de “ilhas de patogenicidade” (SPI), especificamente SPI – 1, descrito no item 1.3.3.

O sistema imune promove uma série de mecanismos de defesa contra agentes infecciosos, dentre estes, podemos citar os Caminhos de Peyer localizados na mucosa intestinal, importante na indução e regulação da resposta imune da mucosa. São formados por uma série de células antigênicas, denominadas “células M” ou células da membrana epitelial do intestino delgado.

As “células M” apresentam microvilosidades irregulares e invaginações citoplasmáticas laterais, podendo realizar fagocitose, responsáveis pela ingestão dos produtos digestivos. Estas células formam uma espécie de bolsa, que ingerem o antígeno, porém não o degrada, apenas conduzindo-o ao interior dos tecidos, mais especificamente às células epiteliais associadas ao folículo (FAE), onde sofrem ação de macrófagos e células dendríticas, iniciando a resposta imune.

Curiosamente alguns patógenos, entre eles, a maioria das *Salmonella*, exploram as “células M” como rota de invasão. Este fato tem sido estudado “in vitro” em ratos, observando-se um rearranjo das membranas apicais das “células M” e redistribuição da actina polimerizada, formando protusões semelhantes a ondas, quando da invasão da bactéria, culminando com a destruição destas células. Este mecanismo ainda não foi completamente esclarecido, mas não é o único caminho de invasão, sendo que o sistema de secreção tipo III, através de suas ilhas de patogenicidade, também representa uma importante rota de invasão do lúmen intestinal. Em pacientes com febre tifóide, tem-se observado ulcerações intestinais, que podem estar correlacionadas com os danos nas células epiteliais (JEPSON & CLARK, 2001).

Salmonella Typhimurium apresenta deficiência em produzir proteínas invasivas através de SPI – 1 e, portanto é uma bactéria não invasiva. No entanto, ela consegue penetrar nas células hospedeiras e causar danos. RESCIGNO et al. (2001) sugeriram que a entrada desta bactéria ocorre via células dendríticas. Verificaram que na presença de bactérias não invasivas, ocorre um aumento de células dendríticas no intestino e a fagocitose das bactérias aumenta. Demonstraram que estas células podem chegar até a superfície celular e fagocitar as moléculas estranhas, num mecanismo de defesa. Verificaram também que após o contato com *Salmonella* Typhimurium, estas células de defesa apresentavam danos, podendo ser, portanto esta a rota de invasão.

1.3.3. Produção de enterotoxinas e citotoxinas:

O Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) consiste em uma organela especializada, responsável por mediar a transferência de proteínas bacterianas, que por sua vez são capazes de interferir em funções metabólicas importantes das células infectadas. É um sistema utilizado por muitas bactérias patogênicas na interação com as células hospedeiras (GÁLÁN, 2001; MARCUS et al., 2000). Compreende um sistema complexo, composto por mais de 20 tipos de proteínas e

outros componentes, tendo sido descrito como um complexo de agulhas que se projetam externamente à membrana bacteriana semelhante ao corpo basal do sistema flagelar (KUBORI et al., 2000). A estrutura do TTSS lembra um aparato flagelar, consistindo de um anel protuberante a partir da superfície bacteriana conectada a uma base que está circundada um anel superior (externo à membrana) e dois anéis inferiores (interno à membrana) (DONNENBERG, 2000). Seu mecanismo de secreção ainda não foi completamente elucidado, no entanto, sabe-se que existe a necessidade de contato entre o patógeno e a célula hospedeira para ativação do sistema de secreção (GÁLAN, 2001), levando à invasão através de células epiteliais não fagocíticas.

Foi descrito que as subespécies de *Salmonella entérica* codificam cinco sistemas de secreção tipo III, localizados em regiões discretas de seus cromossomos, denominadas “Ilhas de Patogenicidade” (SPI), essenciais para sua virulência (MARCUS et al., 2000). Destas, duas são as melhores estudadas quanto ao sistema invasivo, denominadas de SPI – 1 e SPI – 2, tendo sido reportado que ambos os sistemas, apesar de serem muito semelhantes, aparentemente exercem funções diferentes, de forma que a interação inicial com as células epiteliais intestinais do hospedeiro e a *Salmonella* ocorre via SPI – 1 (no lúmen intestinal), através do contato entre hospedeiro – patógeno, seguida da injeção de proteínas responsáveis pela virulência dentro das células hospedeiras, habilitando a entrada do patógeno no epitélio intestinal e finalmente, a infecção sistêmica fica a cargo do sistema SPI – 2, somente após o acesso do patógeno à célula hospedeira (GÁLAN, 2001).

Tem sido demonstrado “in vitro” que SPI – 2 pode estar relacionada com a inibição de mecanismos de defesa produzidos dentro dos fagócitos, como por exemplo, a ação de lisozimas. Em seguida, ocorre a evasão dos macrófagos, onde tem sido reportado que SPI – 1, através de codificação de proteínas específicas, induz a morte dos macrófagos nos caminhos de Peyer, ficando livre para alcançar a circulação sanguínea e disseminar para outros órgãos. *Salmonella*

produz citotoxinas que podem induzir a necrose de células eucarióticas (MASTROENI & SHEPPARD, 2004).

Alguns exemplos de proteínas responsáveis pela virulência do SPI – 1 secretadas são SptP (proteína *Salmonella* tyrosina fosfatase), SipA (proteína *Salmonella* invasiva), SipB, SipC, entre outras. SptP foi descrita como uma enzima capaz de romper estrutura da actina quando injetada nas células epiteliais. A proteína SipA liga-se à actina, polimerizando-a, enquanto SipB e C são liberados no citosol induzindo a apoptose das células hospedeiras (MARCUS et al., 2000). A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma de morte celular na qual a própria célula participa ativamente em sua própria destruição, a qual é caracterizada por uma série específica de transformações morfológicas e bioquímicas. A morte por apoptose é importante, entre outras coisas, como um mecanismo de defesa contra infecções virais (VEKRELLIS et al., 1997).

Além deste mecanismo do sistema de secreção tipo III, tem sido descritos outros fatores localizados fora deste sistema de secreção, uma proteína denominada SopE é utilizada para a entrada na célula hospedeira e uma vez lá, estimula um rearranjo da estrutura celular (GOOSNEY et al., 1999). MUKHERJEE et al (2002) acreditam que SopE seja provavelmente o principal fator que permite a sobrevivência da *Salmonella* dentro dos fagócitos, por ocasião da invasão celular.

1.3.4. Presença de plasmídeos:

Dentro dos sorotipos adaptados ao hospedeiro animal estudados (*Salmonella* Dublin, *S. Cholerasuis*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* e *S. Abotusovis*), com exceção de *Salmonella* Typhi, todos apresentam uma região de 8 kbp (8 kilopares de bases) relacionada com a patogenicidade formada por genes estruturais denominados *spv* (“*Salmonella* plasmid virulence”). Também sorovares adaptados tanto a animais quanto a humanos como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* apresentam este plasmídeo de virulência (LIBBY et al., 1997).

Esta região é formada por quatro destes genes estruturais (*spvA*, *spvB*, *spvC* e *spvD*), além de um gene regulador (*spvR*), que estão relacionados com o aumento da taxa de crescimento da *Salmonella* dentro do hospedeiro (GULIG et al., 1998; KOWARZ et al., 1994; LIBBY et al., 1997), além de serem importantes fatores capazes de aumentar a virulência (EL-GEDAILY et al., 1997, MARCUS et al., 2000). O gene *spvR* ativa a transcrição dos genes estruturais *spvABCD* a partir de um modelo estrutural *spvA*.

FIERER e colaboradores (1993) demonstraram que *spvB* tem sua produção induzida imediatamente após fagocitose, porém esse gene está relacionado com o aumento na taxa de crescimento da *Salmonella* e não com sua sobrevivência dentro dos macrófagos. Assim, o aumento na taxa de crescimento é suficiente para converter uma infecção localizada em uma infecção altamente letal.

Muitos serovares isolados de humanos e animais, não apresentam esse plasmídeo, porém, os sorovares que carregam *spv* podem ter um aumento na severidade da infecção levando a casos fatais (LIBBY et al., 1997).

Dentro deste raciocínio, VALDEZ e colaboradores, determinaram que existia uma correlação entre a presença do gene *spvB* e diarreia em crianças, estudo este realizado no México em 2004.

Em resumo, a patogênese provocada por *Salmonella* é um sistema complexo e multifatorial (WALLIS & GALYOV, 2000) com consideráveis progressos feitos na caracterização do seu mecanismo de virulência, principalmente através da biologia molecular, sendo que muitas interações ainda são desconhecidas. As análises da interação *Salmonella* – hospedeiro “in vivo” indicam que o processo infeccioso é resultante de eventos heterogêneos que não afetam de forma simultânea e igual o sistema imune do hospedeiro (MASTROENI & SHEPPARD, 2004). Assim sendo, muitos estudos ainda precisam ser realizados para efetivamente mostrar uma visão mais realista da patogênese desta bactéria, de forma a permitir, não só a prevenção com o uso de vacinas, mas também um tratamento mais eficaz da doença depois de instalada.

1.4. Os diferentes sorotipos mais envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

Neste tópico pretende-se descrever alguns sorotipos de *Salmonella* mais conhecidos e principalmente os mais envolvidos em problemas de saúde pública em todo mundo.

1.4.1. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhi (*S. Typhi*)

Salmonella enterica subespécie *enterica* serovar Typhi, ou simplesmente *Salmonella* Typhi, é responsável pela febre tifóide ou febre entérica, que representa a forma mais severa de infecção por *Salmonella*, fatal se não tratada e com uma taxa de mortalidade de 10 % das pessoas infectadas. Para a *S. Typhi* o antígeno somático específico (antígeno O) é o tipo “09”, o antígeno flagelar (antígeno H) é o tipo “d” e o antígeno Vi (cápsula extracelular) é positivo. Este último antígeno apresenta grande virulência (CVE/SP, 2001).

O ser humano é o único hospedeiro conhecido desta bactéria, apresentando patogenicidade limitada para a maioria dos animais. Análises isoenzimáticas têm sugerido que as cepas de *S. Typhi* isoladas em todo o mundo estão altamente relacionadas, possuindo idênticas características bioquímicas e sorológicas (PARKILL et al. 2001). O quadro 1 apresenta resumidamente as características de crescimento e controle desta e demais *Salmonella* descritas.

PARKILL e colaboradores (2001) destacam a existência de cepas de *S. Typhi* resistentes a várias drogas (MDR) entre os antibióticos mais comuns e resistência clínica a fluoroquinolonas, o mais efetivo agente antimicrobiano no tratamento da febre tifóide, como exemplo a variante CT18, fazendo parte do grupo de microrganismos MDR emergentes.

O seqüenciamento genético completo de vários componentes do gênero *Salmonella*, tem evidenciado grupamentos de pares de base idênticos e variações

nesta seqüência que confere a característica própria de cada sorovar, além de algumas semelhanças com outras enterobactérias como *E. coli* (PARKILL et al., 2001; MCCLELLAND et al., 2001).

1.4.2. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*):

É a principal responsável por gastroenterite em seres humanos, sendo muito utilizada em estudos com ratos como modelo para febre tifóide (CVS/SP, 2001). Nos últimos anos tem se registrado um aumento de casos cepas variantes resistentes a várias drogas (MDR). Entre elas têm-se os primeiros relatos de cepas DT29 resistentes nos anos 60, seguindo-se para variantes DT193, DT204 e DT104. A *Salmonella Typhimurium* DT 104 é um patógeno emergente e extremamente virulento, tendo o maior número de ocorrências nos últimos anos, responsável por vários casos fatais em todo o mundo. É considerado o segundo sorotipo de maior prevalência, logo após a *Salmonella* sorotipo Enteritidis. Os fatores responsáveis por esta resistência a várias drogas ainda não está bem esclarecida, existindo várias possibilidades, entre elas o comércio de animais entre os países, a extensiva e repetida mistura de diferentes raças entre o gado bovino, sugerindo uma transferência genética horizontal , assim como ao uso de antibióticos como terapêutica e doses subterapêuticas como suplemento alimentar em aves e animais domésticos, suportando a idéia de que o uso de antibióticos pode promover uma seletiva resistência bacteriana e conseqüente persistência dos mesmos (RABSCH et al., 2001).

1.4.3. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*)

Salmonella Enteritidis faz parte do grupo de patógenos emergentes transmitidos por alimentos. Tanto no continente Americano como na Europa, a

maioria dos surtos foi relacionada com alimentos que continham ovos de galinha crus ou mal cozidos, tornando-se um importante agente de toxinfecções alimentar. Este produto até então não estava relacionado com a transmissão desta bactéria. RABISCH e colaboradores (2001) relatam que uma possível causa para que ovos de galinha tenham se tornado uma importante fonte de transmissão deste patógeno possa estar relacionada com a erradicação de *S. Gallinarum* de aves, pelo uso de antibióticos na ração animal. A explicação pode estar relacionada com a presença de um antígeno denominado “O9”, uma estrutura superficial imunodominante presente em *S. Gallinarum*, que leva a uma competição entre este e *S. Enteritidis*, resultando que o sorotipo com maior transmissibilidade, no caso *S. Gallinarum*, já adaptado ao hospedeiro, possa excluir o competidor (*S. Enteritidis*).

Uma vez que as aves estejam infectadas a contaminação dos ovos pode ocorrer via transovariana ou através da casca. Uma vez presente no albúmen a *Salmonella* apresenta habilidade para migrar para a gema, mais rica em nutrientes e se multiplicar (BRAUN & FEHLHABER, 1995).

1.4.4. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin (*S. Dublin*)

É um sorotipo altamente adaptado a hospedeiro animal, porém apresenta severa patologia ao ser humano. Representa uma perda econômica significativa entre rebanhos bovinos devido à morte ou aborto do animal.

NORRIS e colegas, em 1998, revelaram que este sorotipo necessita de uma proteína denominada SopB para apresentar enteropatogenicidade, sendo determinante na interferência do metabolismo do inositol fosfato, não sendo no entanto, necessária a invasividade da bactéria e verificaram que se trata da enzima inositol fosfato fosfatase.

Quadro 1: Características de crescimento e controle de *S. Typhi*

Salmonella Typhi		
Condições de crescimento (CVE, 2001)	Temperatura	Mínima = 7 ^o C Máxima = 45 ^o C Ótima = 35-37 ^o C
	Aw	Mínima = 0,94 Máxima => 0,99 Ótima = 0,99
	pH	Mínimo = 3,8 Máximo = 9,5 Ótimo = 7-7,5
	Atmosfera	<u>Anaeróbico facultativo.</u> Sob atmosfera de nitrogênio apresenta crescimento lento.
Particularidades	<ul style="list-style-type: none"> • Não produz toxina nos alimentos. • Grupos de risco em áreas não endêmicas = crianças entre 0 a 5 anos e imunodeprimidos. • Principal fonte de contaminação = manuseio inadequado dos alimentos e transmissão através de água contaminada. • O ser humano é o único reservatório deste microrganismo. • Não infecta animais. • <i>Salmonella</i> em geral é injuriada pelas baixas temperaturas (refrigeração e congelamento), porém pode sobreviver ao congelamento por períodos longos (KICH, 2004) • <i>Salmonella Typhi</i> pode resistir ao calor de 60^oC/1h • <i>Salmonella</i> tem baixa capacidade competitiva em relação a outros microrganismos contaminantes, necessitando de fontes ricas em nutrientes. 	
Controle	HACCP e Teoria dos obstáculos (Hurdles)	<ul style="list-style-type: none"> • É inativada em 1 dia quando exposta a 30 % de NaCl. • É inativada quando exposta a temperatura acima de 63^oC por 15 segundos. • Manter os alimentos fora da faixa de risco (entre 5 e 60^oC). • Higiene pessoal, lavagem das mãos. Evitar manuseio direto dos alimentos. • A cloração da água é suficiente para eliminar <i>Salmonella</i>.
Observações:	<p><i>Salmonella</i> de diferentes sorotipos apresenta características acima descritas muito próximas, principalmente em relação às condições de crescimento, podendo alterar o hospedeiro: alguns sorovares infectam somente os seres humanos (<i>S. Typhi</i>, <i>S. Paratyphi</i>), outros somente os animais (<i>S. Gallinarum</i> (aves), <i>S. Abortusovis</i> (ovinos)), enquanto a maioria não tem preferência por um hospedeiro em especial, constituindo neste último grupo a maioria dos responsáveis por salmoneloses (TERRAGNO et al., 2003)</p>	

1.4.5. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Choleraesuis (*S. Choleraesuis*)

Assim como a *S. Dublin*, também é um sorotipo altamente adaptado a hospedeiro animal, porém, apresentando patologia ao ser humano. É extremamente invasiva e geralmente associada com bacteremia em seres humanos levando a infecções sistêmicas que necessitam de uma terapia antimicrobiana. Até 1999 este sorotipo era susceptível a fluoroquinolonas. Porém desde 2000 CHIU et al (2004) tem relatado que cepas isoladas de ambos hospedeiros, humanos e suínos, apresentaram rápido aumento da resistência à ciprofloxacina. Os autores revelam também um marcante aumento da resistência a fluoroquinolonas, fato preocupante, já que esta droga, considerada de primeira linha, faz parte do tratamento sistêmico.

1.5. Alimentos envolvidos com a transmissão de *Salmonella*

Vários alimentos têm sido relatados como responsáveis pela transmissão desta bactéria ao homem, constituindo uma das principais formas de contágio.

Diferentes fontes de contaminação são descritas, principalmente alimentos de origem animal, incluindo carnes vermelhas, leite não pasteurizado, ovos crus ou mal cozidos, além de produtos relacionados com ovos, quer seja pelo fato do animal estar infectado, quer seja por problemas durante o processamento dos alimentos (RABSCH et al. 2001). SCHOENI et al. (1995) elaboraram um estudo onde observaram que *Salmonella* pode penetrar no interior de ovos, ocorrendo o desenvolvimento do patógeno durante a estocagem. Vale lembrar que a presença de *Salmonella* leva à condenação de todo um lote de alimentos, gerando grandes prejuízos econômicos (BRASIL, 2001).

Dependendo das condições de armazenamento, distribuição e preparo mesmo um pequeno inóculo pode oferecer sérios riscos de toxinfecção por *Salmonella*, desde que elas possam se reproduzir. No entanto, qual é o tamanho

do inóculo que melhor represente a dose infectante? Relata-se que é necessário um mínimo de 10^5 células para iniciar uma infecção. Experimentos foram realizados em seres humanos voluntários por HORNICK e colaboradores em 1970 (apud LEVINE et al, 2001), onde confirmaram, além da dose infectante, a faixa de incubação e a relação com a quantidade de inóculo, ou seja, quanto maior o inóculo, maior o número de casos e menor o período de incubação, como demonstrado no quadro 2.

Quadro 2: Modelo experimental da febre tifóide, relação entre o inóculo ingerido, taxa de manifestação clínica e período de incubação:

Dose de <i>S. Typhi</i> (em 45 mL de leite)	Manifestação clínica da febre tifóide	Tempo médio de incubação
10^9 CFU	95%	5 dias
10^7 CFU	50%	7,5 dias
10^5 CFU	28%	9 dias
10^3 CFU	0%	-

Fonte: HORNICK et al, 1970 – apud: LEVINE et al., 2001.

O monitoramento, controle e prevenção de doenças de origem alimentar (DTAs) no Brasil ficam ao encargo, em nível Federal, Estadual e Municipal, do Centro de Vigilância Epidemiológica (VE-ENEPI/FNS/MS). Atualmente tem-se uma disseminação de DTAs devido à globalização da economia, alta mobilidade populacional, mudanças de hábitos alimentares, ainda um incipiente controle do preparo dos alimentos em muitos locais, a existência de produções clandestinas e sem controle e a própria precariedade dos sistemas de vigilância. No entanto, em qualquer caso de suspeita de salmonelose, a notificação aos órgãos competentes torna-se compulsória (EDUARDO, 2003).

Com a globalização e a crescente exportação e importação de alimentos, são essenciais os cuidados em relação à qualidade higiênico-sanitária. Só o Brasil em relação à carne suína exportou cerca de 250 mil toneladas em 2001, obtendo

um crescimento de 32,7% em 2002, tornando o país o quarto maior exportador (KICH & CARDOSO, 2004).

1.6. Ocorrência no Brasil e no mundo (1995 a 2005).

Em pleno século XXI, apesar da legislação, da crescente busca de conscientização da população e fiscalização, ainda são relatados diversos casos de surtos de salmoneloses em todo o mundo, incluindo países que trabalham com níveis de segurança alimentar considerados excelentes, como EUA e União Européia, sendo geralmente relacionados com alimentos.

Uma das mais sérias formas de salmoneloses, a febre tifóide é considerada uma doença endêmica em muitos países em desenvolvimento, em especial na América do Sul, América Central, África e parte da Ásia, tendo sido registrados em torno de 150 casos/100.000 habitantes por ano na América do Sul e 900 casos/100.000 habitantes por ano na Ásia (DDTHA/CVE, 2004).

No Estado de São Paulo, de acordo com dados obtidos pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE/SP), o número de casos de febre tifóide vem decrescendo significativamente desde 1990, como registrado no gráfico da figura 6 (DDTHA/CVE, 2004).

Nos últimos anos tem-se relatado casos crescentes de surtos de salmonelose não tifoidal, relacionados principalmente com *S. Typhimurium* com sorovares resistentes a múltiplos antibióticos e *S. Enteritidis* associada principalmente com ovos (RABSCH et al. 2001).

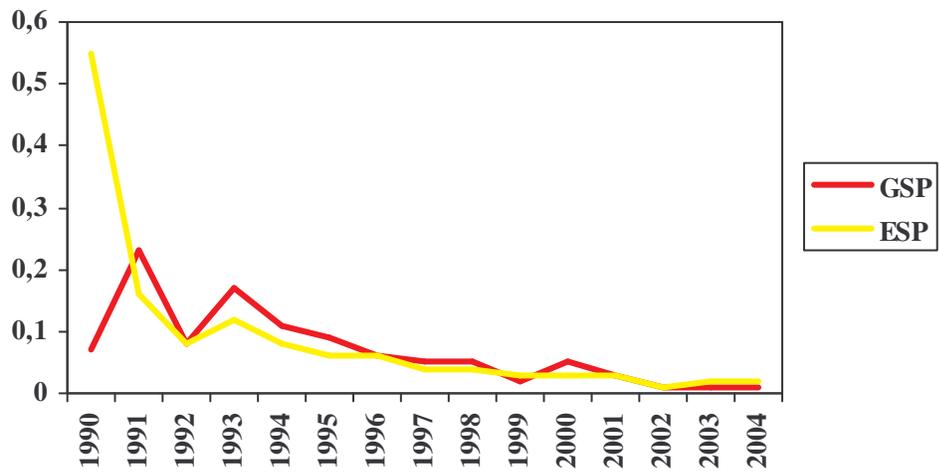


Figura 6 – Gráfico da incidência de Febre Tifóide - Coeficientes de incidência por 100 mil habitantes de casos confirmados autóctones segundo a região, 1990-2004 (DDTHA/CVE, 2004).
(GSP = Grande São Paulo; ESP = Estado de São Paulo).

CAPÍTULO 2:

Métodos de Detecção de *Salmonella* em Alimentos

2. Métodos de detecção de *Salmonella* em alimentos.

2.1. Método cultural tradicional.

Visa à detecção de células viáveis de *Salmonella* em alimentos, constituindo o método oficial na maioria dos países e o mais utilizado. O rastreamento de *Salmonella* através deste método envolve basicamente 4 a 5 fases distintas e pode ser utilizado para todo tipo de alimento, desde que sejam tomadas as devidas precauções na coleta e preparo das amostras, os quais estão bem descritos em BAM/FDA (2001) e Silva et al. (2001).

Situações de stress, como a competição com outros microrganismos no alimento, variações de temperatura, refrigeração, calor, conservantes, etc. levam a injúria das células alvo, que apresentam baixo poder competitivo. Com a finalidade de recuperar estas células injuriadas, existe a necessidade de uma etapa inicial denominada pré-enriquecimento em meio não seletivo, para que possa ser avaliada sua presença ou não.

A legislação exige ausência total em 25g ou 25ml do alimento (BRASIL, 2001). Esta quantidade é então adicionada em 225ml de um caldo nutriente, geralmente o caldo lactosado, sendo que alguns laboratórios utilizam água peptonada tamponada. O caldo lactosado é o recomendado pela Association of Analytical Chemists (AOAC), pelo Food and Drug Administration (BAM/FDA,2001), e também pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT,1991). Esta primeira etapa demora 24h, incubada a 35⁰C. O pH do Caldo Lactosado deve ser ajustado para 6,8±0,2 com NaOH ou NaCl 1N, depois da homogeneização da amostra, visando proporcionar um ambiente controlado e favorável ao desenvolvimento da *Salmonella*.

Em seguida a amostra deve passar para um meio de enriquecimento seletivo, que irá inibir outros microrganismos presentes no alimento, favorecendo o desenvolvimento da bactéria alvo. São utilizados dois tipos diferentes de meio seletivo, geralmente o caldo selenito cistina (SC) e o caldo tetrionato (TT). A

quantidade de amostra a ser adicionada é de 1,0ml do meio pré-enriquecido para 10ml de ambos os caldos. Esta segunda etapa tem um período de incubação de 24h, a 35⁰C. Para alimentos desidratados a AOAC validou o procedimento de refrigeração dos caldos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo (TT e SC) durante o final de semana. As amostras enriquecidas podem ser mantidas a 4⁰C por até 72 horas (AOAC Official Method 994.04).

Na terceira etapa, denominada plaqueamento seletivo, os tubos com os caldos de enriquecimento seletivo são agitados em agitador “vortex” e a cultura de cada um dos tubos de TT e SC são então estriadas em placas Ágar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e incubadas a 35⁰C/24h. As características típicas das colônias de *Salmonella* nesses meios estão listadas no quadro 3.

Caso sejam detectadas colônias características, segue-se então, para a etapa de confirmação preliminar. Pelo menos duas colônias típicas de cada placa são submetidas ao teste sorológico somático polivalente e aos testes de Urease, crescimento em Ágar Lisina Ferro (LIA) e crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), com incubação por um período de 24h a 35⁰C. As características típicas de *Salmonella* nesses meios estão descritas no quadro 4. Nesta etapa, as culturas que não apresentarem características típicas, não precisam seguir para as etapas subseqüentes.

Finalmente, na quinta e última etapa é realizada confirmação definitiva, efetuando-se os testes sorológicos e bioquímicos. Para os testes bioquímicos são recomendados “kits” de identificação validados pela AOAC para *Enterobacteriaceae*, como: API 20E (BioMeriéux Vitek), Vitek GNI (BioMeriéux Vitek), Enterotube II (Beckton Dicson), *Enterobacteriaceae* II (Beckton Dicson) e Micro ID (Remel). Alternativamente, pode-se inicialmente realizar os testes bioquímicos mais relevantes para análise de *Salmonella*, como por exemplo, o teste do Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer, Citrato (IMViC) e teste da Uréia.

Na Figura 7 temos um resumo das principais características bioquímicas de *Salmonella*.

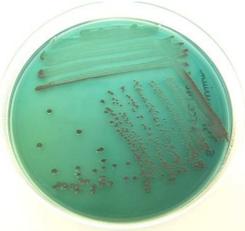
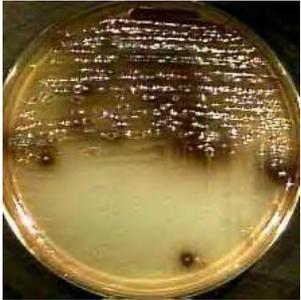


FIGURA 7: Principais características bioquímicas de *Salmonella*

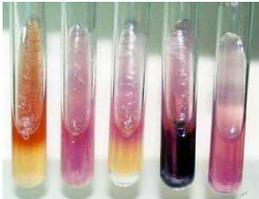
O método tradicional é bastante sensível, com limite de detecção de uma unidade formadora de colônia/25g de amostra, porém, é trabalhoso e lento, o que limita a capacidade de análise dos laboratórios. A etapa mais cara, mais trabalhosa e mais demorada é a confirmação, porque envolve a caracterização sorológica e bioquímica de várias colônias, isoladas das placas de meios seletivos diferenciais.

Em função disso, há um grande interesse por métodos alternativos mais rápidos e mais simples, que possam ser utilizados em lugar do método tradicional.

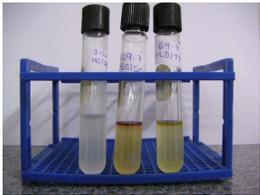
Quadro 3: Características das colônias de *Salmonella* na fase de plaqueamento diferencial (SILVA et al., 2001):

MEIO SELETIVO	CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS	OBSERVAÇÕES
<p style="text-align: center;">HE</p>  <p style="text-align: center;">S. Typhimurium ATCC 14028 Ágar HE</p>	<p>Colônias transparentes, verde azuladas, com ou sem centro preto.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir colônias inteiramente pretas 2) Colônias de fermentadores de lactose ou sacarose são de cor salmão e não transparentes
<p style="text-align: center;">BS</p>  <p style="text-align: center;">Salmonella sp Agar BS</p>	<p>Colônias marrons ou pretas com ou sem brilho metálico.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) O meio ao redor das colônias muda gradativamente para uma coloração marrom a preta, com o prolongamento do tempo de incubação. 2) As placas devem ser observadas com 24 horas de incubação e, na ausência de colônias típicas, novamente observadas com 48 horas.
<p style="text-align: center;">XLD</p>  <p style="text-align: center;">S. Typhimurium ATCC 14028 Ágar XLD</p>	<p>Colônias transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro preto.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. 2) Cepas de fermentadores de lactose ou sacarose produzem colônias amarelas com ou sem centro preto. 3) Diversas cepas de <i>Salmonella</i> podem apresentar colônias transparentes amarelas atípicas, com ou sem centro preto.

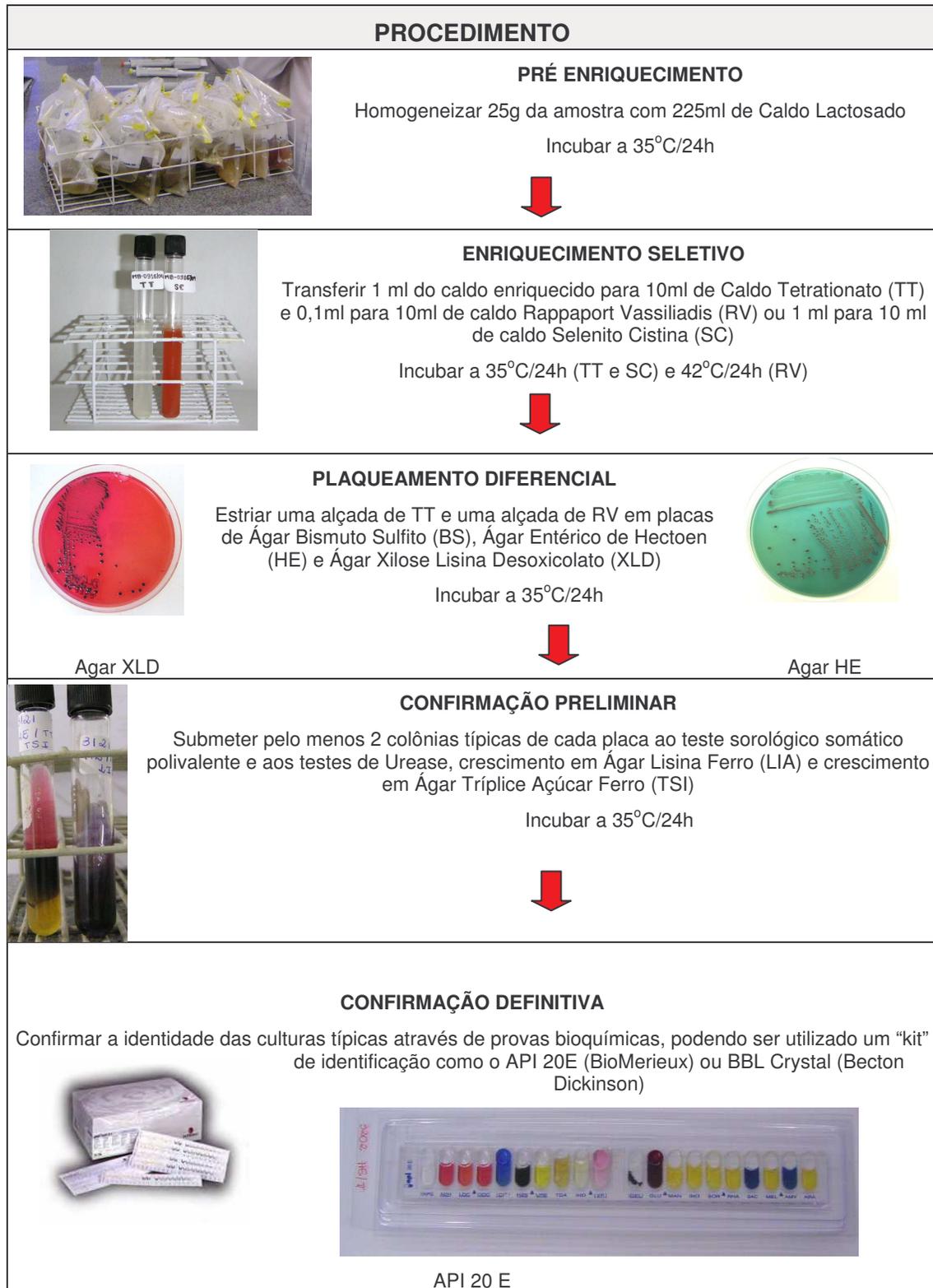
Quadro 4: Características das cepas de *Salmonella* na fase de confirmação preliminar (SILVA et al., 2001):

TESTE	CARACTERÍSTICAS DO MEIO	Temperatura /Tempo de incubação	OBSERVAÇÕES
SOROLÓGICO SOMÁTICO POLIVALENTE	Ocorre aglutinação com o antisoro específico para <i>Salmonella</i> .	Resposta imediata	-
UREASE  A B	POSITIVO = alteração da cor do meio de pêsego para cor de rosa escuro. NEGATIVO = o meio permanece na cor original.	35 ^o C/24h	A maioria das <i>Salmonella</i> é urease negativa.
TSI  A B C D E	Rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H ₂ S (escurecimento do ágar).	35 ^o C/24h	Reação atípica em TSI que não deve ser descartada se as demais reações em LIA apresentarem-se típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos), com ou sem produção de H ₂ S.
LIA  A B C D E	Fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração do meio), com ou sem produção de H ₂ S (escurecimento do meio).	35 ^o C/24h	Reação atípica, que não deve ser descartada se as demais reações em TSI apresentarem-se típicas: fundo amarelado, com rampa alcalina, com ou sem produção de H ₂ S.
<p>Interpretação: URÊIA – A = negativo; B = positivo. TSI – A = meio sem inóculo; B = suspeito; C, D e E = positivos. LIA – A = positivo; B = negativo; C = suspeito; D = positivo; E = meio sem inóculo.</p>			

Quadro 5: Características das cepas de *Salmonella* em alguns testes da fase de provas bioquímicas (SILVA et al., 2001):

TESTE	CARACTERÍSTICAS DO MEIO	Temperatura/Tempo de incubação	OBSERVAÇÕES
<p>INDOL</p> 	<p>POSITIVO: formação de um anel vermelho violeta na superfície do meio de cultura. NEGATIVO: o anel permanece amarelo</p>	<p>35°C/24h</p>	<p>As cepas de <i>Salmonella</i> são Indol-negativas.</p>
<p>VOGES-PROSKAUER</p> 	<p>POSITIVO: cor vermelha ou rósea do meio. NEGATIVO: meio amarelado ou esverdeado.</p>	<p>35°C/24h</p>	<p>As cepas de <i>Salmonella</i> são VP -negativas.</p>
<p>VERMELHO DE METILA</p> 	<p>POSITIVO: meio com coloração vermelha NEGATIVO: meio com coloração amarelada.</p>	<p>35°C/48h</p>	<p>As cepas de <i>Salmonella</i> são VP-positivas.</p>
<p>CITRATO SIMMONS</p> 	<p>POSITIVO: alteração da cor do meio de verde para azul. NEGATIVO: coloração do meio inalterada.</p>	<p>35°C 48 a 96h</p>	<p>As cepas de <i>Salmonella</i> são CM-positivas.</p>

Quadro 6: Etapas da análise de *Salmonella* pelo método tradicional (FDA, 1998).



2.2. Métodos alternativos de análise de *Salmonella* em alimentos

O método de análise de *Salmonella* tradicional pode levar de 3 a 4 dias para produzir um resultado negativo e mais do que 7 dias para confirmar um resultado positivo. Por isso, é de se esperar que a busca por métodos mais rápidos na análise de alimentos seja intensa (BAILEY, 1998). No entanto, vários destes métodos não são necessariamente utilizados pelo FDA e AOAC, já que uma grande quantidade deles está sendo criada a cada dia. Muitos já estão disponíveis no mercado em forma de “kits”, com a intenção de facilitar o dia a dia de análises laboratoriais.

A utilização de um método alternativo ao método cultural irá depender das necessidades de cada laboratório individualmente, sendo, no entanto altamente recomendada a realização de uma validação interna, cujo processo será discutido no capítulo 3.

A AOAC tem avaliado e validado alguns deles, oficializando-os. Entretanto os métodos rápidos têm sido na maioria das vezes, utilizados como um “screening”, de forma que os resultados negativos são aceitos sem questionamento, enquanto os resultados positivos necessitam de uma etapa de confirmação, geralmente utilizando o método cultural tradicional (FDA, 2001).

Basicamente, os métodos alternativos podem ser agrupados em: análises baseadas em provas bioquímicas, tais como API 20E e BBL Crystal, que complementam o método cultural; análises baseadas nos ácidos nucleicos, tais como GENE-TRAK, BAX e RIBOPRINTER; análise baseadas em reações antígeno-anticorpo (imunológicos), tais como RAPID TEST, 1-2 TEST, *Salmonella*-TEK e VIDAS, tendo a maioria dos métodos citados sido aceita como oficial pela AOAC em primeira instância ou ação final (FDA, 2001).

2.2.1. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos exploram a reação antígeno/anticorpo e podem apresentar vários formatos, sendo mais comuns os imunoenaios enzimáticos (ELISA), os ensaios de imunodifusão (IMD), os ensaios de imunoprecipitação (IMP) e os ensaios de separação imunomagnética (IMS) (ENTIS et al., 2001). A maioria desses métodos utiliza anticorpos polivalentes para detecção do antígeno flagelar de *Salmonella*, o que representa uma limitação na análise de produtos como frangos, por exemplo, onde a presença de cepas imóveis não é incomum. Além disso, nenhum deles tem sensibilidade para aplicação direta no alimento, a maioria exigindo três etapas de enriquecimento, para levar a população a níveis detectáveis e enriquecer flagelos (ANDREWS et al., 2001). Um terceiro fator limitante é que todos os ensaios são presuntivos e, em caso positivo devem ser confirmados pelo método tradicional, dando seguimento à análise a partir do caldo de enriquecimento seletivo.

2.2.2. Métodos moleculares baseados nos ácidos nucléicos

Os métodos moleculares aplicáveis à detecção de patógenos em alimentos são as sondas genéticas e a reação de polimerase em cadeia (PCR), que começam a ser popularizados através do desenvolvimento de “kits” comerciais (ANDREWS et al., 2001).

2.2.2.1. Sondas genéticas

De acordo com HILL et al. (1998), a detecção por sondas genéticas é fundamentada na presença ou ausência de genes específicos do microrganismo alvo e a base física dos testes é a própria estrutura de dupla fita do DNA. A estabilidade da conformação em fita dupla é conferida pelas pontes de hidrogênio estabelecidas entre os pares de bases dos nucleotídeos, que podem ser quebradas elevando-se o pH (acima de 12) ou a temperatura (acima de 95°C).

Isso desnatura o DNA em fitas simples e, quando o pH ou a temperatura retornam ao normal, as pontes de hidrogênio são restabelecidas e a molécula volta à conformação de fita dupla. A fonte das fitas simples que se alinham na formação da dupla hélice é irrelevante, se houver complementaridade entre elas. Se cada fita for originária de fontes diferentes, a molécula resultante é chamada híbrida e o processo é chamado hibridização de DNA. Quanto maior for a homologia entre a seqüência de bases de cada fita simples complementar, maior será a estabilidade da molécula híbrida.

Uma sonda genética é um fragmento de DNA marcado, que contém a seqüência total ou parcial de um gene específico com função conhecida. Colocadas em contato com o DNA dos microrganismos presentes em uma amostra, podem hibridizar com uma seqüência homóloga complementar, sinalizando a presença do microrganismo alvo. Para a detecção de *Salmonella* há um “kit” de sondas genéticas disponível no mercado, o Gene Trak *Salmonella* Detection Kit, cuja seqüência alvo é o RNA ribossômico (rRNA). O ensaio inclui uma etapa de pré-enriquecimento não seletivo (35°C/18-24h), uma etapa de enriquecimento seletivo (35°C/6h para alimentos processados, 35°C/18h para produtos cárneos crus) e uma etapa de pós-enriquecimento (35°C/12-16h para alimentos processados, 35°C/6h para produtos cárneos crus). Assim como os métodos imunológicos, é um ensaio presuntivo e, em caso positivo, os caldos de enriquecimento seletivo e de pós-enriquecimento devem ser estriados em placas de meios seletivos diferenciais, dando-se prosseguimento à análise pelo método tradicional (ANDREWS et al., 2001).

2.2.2.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de PCR permite a replicação “in vitro” de uma seqüência específica do DNA genômico pertencente a um patógeno, de forma a não haver necessidade de conhecer a seqüência completa do DNA alvo. Desta forma SANTOS et al (2001), definiram que a seleção ou escolha destas seqüências

torna-se um parâmetro crítico dentro de uma análise por PCR e no caso da *Salmonella* a região escolhida deve ser importante na codificação de proteínas essenciais à patogenicidade. A seqüência do gene *invA* por exemplo é específica em codificar proteínas relacionadas à facilidade de penetração das bactéria nas células hospedeiras e essencial à patogenicidade, como visto no capítulo 1. Este gene está presente nas espécies *enterica* e *bongori* e em nenhuma outra *Enterobacteriaceae*, tornando-se portanto um excelente primer a ser utilizado na identificação de *Salmonella*.

De acordo com O'SULLIVAN (1999), a técnica de PCR, na sua forma mais simples, é utilizada para amplificar regiões (seqüências) específicas de DNA em bilhões de vezes, usando uma polimerase termoestável (usualmente *Taq*, a DNA polimerase de *Thermus aquaticus*), deoxinucleotídeos (dNTP) e dois iniciadores ("primers"), cujas seqüências são complementares entre si e à seqüência alvo ("template"). A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, geralmente 30 a 40 e, durante cada ciclo, ocorre a seguinte seqüência de reação: aquecimento a aproximadamente 94°C, para desnaturar a fita dupla do DNA, resfriamento a menos de 55°C (condição típica), para que os iniciadores hibridizem com as seqüências que lhes são complementares nas fitas simples obtidas e reaquecimento a 72°C, para que a polimerase sintetize a cópia do DNA na região entre os dois iniciadores. Como cada fragmento gerado torna-se o alvo do próximo ciclo de PCR, a amplificação é exponencial e uma simples cópia pode ser potencialmente amplificada a 2^n , onde "n" é o número de ciclos de PCR. Assim, num PCR típico de 35 ciclos, podem ser geradas aproximadamente $3,4 \times 10^{10}$ cópias da seqüência alvo (figura 8). Também é possível utilizar mais de um conjunto de iniciadores, diferentes entre si, para permitir a amplificação simultânea de mais de uma seqüência alvo, o que caracteriza a técnica de Multiplex PCR. Após a amplificação os fragmentos obtidos são separados por eletroforese em gel de agarose, gerando um perfil de fragmentos característico das cepas testadas.

A especificidade do método na detecção de um microrganismo alvo é baseada na utilização de iniciadores que amplifiquem especificamente seqüências

características desse microrganismo. Se houver conhecimento de uma ou mais seqüências que sejam exclusivas do DNA do alvo, o resultado do ensaio será definitivo, não exigindo confirmação. Se as seqüências não forem exclusivas, devem ser pouco comuns em outras cepas do mesmo ambiente e o resultado do ensaio será presuntivo. A combinação de vários pares de iniciadores permite amplificar mais de uma seqüência alvo, o que aumenta muito a especificidade do ensaio e reduz a taxa de falsos positivos.

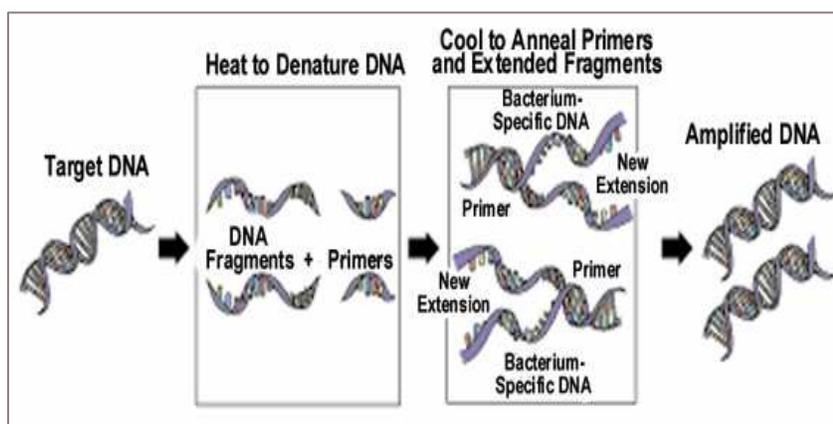


Figura 8: PCR – amplificação.

2.3. Método A-BAX System®.

Uma das mais recentes tecnologias na detecção de microrganismos patogênicos é o A-BAX System® da Dupont/Qualicon, baseado na automação das análises de alimentos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

PCR apresenta um potencial para uma rápida e definitiva detecção de patógenos e apesar de ser uma tecnologia já bastante difundida e utilizada em muitos laboratórios, somente há poucos anos tem se disponibilizado testes comerciais (BAILEY, 1998), de forma a tornar mais ágeis os trabalhos em laboratório.

Este sistema de análise permite detecção rápida e sensível, eliminando várias etapas de subculturas, e como é baseado na análise de DNA pode ser

considerado definitivo, não sendo necessário recorrer a provas bioquímicas ou imunológicas, o que já não acontece com a maioria dos outros métodos. Ele é capaz de amplificar uma seqüência de DNA de 800 bp característica de *Salmonella*, não encontrada em outros gêneros de bactérias. Uma única cópia do DNA alvo pode ser ampliada em torno de 10^7 vezes em 2 a 3 horas (BAILEY, 1998).

As vantagens ficam por conta da automação da análise, de forma a eliminar o preparo e manuseio de vários reagentes, tais como enzimas, primers e nucleotídeos, já que estes ficam concentrados em um tubo Eppendorf em um único tablete, como mostra o quadro 7-d, dispensando qualquer etapa de preparação, e da rapidez e agilidade.

Requer um período de enriquecimento em dois estágios, o primeiro em caldo de enriquecimento a 35°C/18-24h, e um segundo cultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion), seguindo-se então, para a lise e aplicação do PCR, que demanda 4 horas adicionais e pode analisar 96 amostras simultaneamente (ANDREWS et al., 2001). As duas etapas de enriquecimento são úteis, no sentido de facilitar o desenvolvimento das células injuriadas da bactéria alvo, igual a todos os outros métodos, sendo que algumas amostras de alimentos ricas em nutrientes, tais como carnes cruas, dispensam o enriquecimento em BHI.

O equipamento e acessórios são apresentados no quadro 7.

Os procedimentos de preparo dos reagentes seguem os seguintes passos (quadro 8):

- a) Preparo do meio de enriquecimento BHI e distribuição em tubos Eppendorf estéreis na quantidade de 500µl por tubo (estoque a 4°C/1 mês).
- b) Preparo do tampão de lise, adicionando 150µl da protease aos frascos com 12ml de solução tampão, que é por sua vez distribuído na quantidade de 200µl em tubos Eppendorf estéreis (estoque a 4°C/1 mês).

A análise tem início como no método cultural tradicional, ou seja, com o pré-enriquecimento, no qual 25g de amostra são incubadas em 225ml de caldo de

enriquecimento (35⁰C/24h). Do pré-enriquecimento é retirada uma alíquota de 10 μ l e adicionada aos frascos com 500 μ l de BHI e incubados por mais 3h a 35⁰C, etapa esta denominada de “Regrow”.

O início da lise propriamente dita, começa com a transferência de 5 μ l do conteúdo do “Regrow” para os frascos contendo 200 μ l do tampão de lise, que segue para extração do DNA em blocos aquecedores. A lise é realizada em duas etapas, sendo que para *Salmonella*, a primeira consiste em colocar os tubos a 37 \pm 2⁰C por 20 minutos, durante o qual ocorre o rompimento da parede celular e, na segunda, os tubos são transferidos para bloco aquecedor a 95 \pm 3⁰C por 10 minutos para liberação do DNA. Para interromper o processo enzimático, os tubos são finalmente colocados em blocos de resfriamento por 5 minutos. A amostra agora passa a ser denominada “lisado”. A partir desta etapa, o processo pode ser interrompido, e as amostras guardadas em geladeira por 72 horas, de forma a facilitar o andamento dos trabalhos laboratoriais.

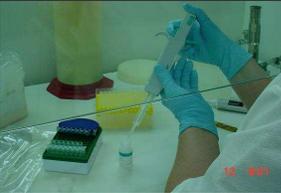
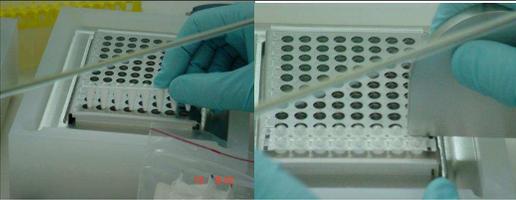
Um volume de 50 μ l do lisado é colocado nos tubos Eppendorf contendo os tabletes de PCR (primers + nucleotídeos + Taq polimerase + corante Syber Green) e fechados com tampas ópticas que acompanham o “kit”. Sem deixar ultrapassar o tempo de 5 minutos, os tubos são levados em “racks” (próprios do equipamento) e colocados no termociclador, que já deve estar com a programação pronta para análise, para repetidos ciclos de desnaturação, anelamento, e extensão, produzindo um aumento exponencial no número de DNA genômico, culminando com o resultado positivo, ou no caso da ausência da bactéria alvo, um resultado negativo.

No termociclador ocorrem as seguintes etapas: aquecimento da amostra a 90–95⁰C por alguns segundos, para separação das fitas de DNA; resfriamento até 55⁰C para anelamento dos primers; elevação da temperatura até 75⁰C para síntese de DNA por meio da adição dos nucleotídeos por ação da Taq DNA polimerase, completando o primeiro ciclo. Estas etapas repetem-se por 38 ciclos no BAX®, sendo que após 3 horas e meia tem-se o resultado, com a presença de mais de um milhão de cópias do DNA alvo.

Quadro 7: Equipamentos e acessórios: A – BAX System®.

EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS A-BAX System®	DESCRIÇÃO
	<p>a) Termociclador, no qual a amostra com os primers, enzima e nucleotídeos passam por uma seqüência de reações culminando com a amplificação e detecção do DNA alvo.</p>
	<p>b) Sistema operacional que acompanha todo o processo de amplificação, registrando os dados, resultando ao final em gráficos de análise.</p>
	<p>c) “Kit” de análise para Salmonella contendo 2 frascos de solução tampão (12ml cada) + 1 frasco de protease (400µl) + tubos com os primers (96 tubos)</p>
	<p>d) Tubo Eppendorf com o tablete contendo primers, nucleotídeos, enzima Taq DNA polimerase e corante SYBR® GREEN.</p>
	<p>e) Placas de verificação, baseadas na freqüência de cada cor, indicando se o equipamento está funcionando normalmente.</p>

Quadro 8: Etapas da análise: A – BAX System®.

PREPARO DE REAGENTES E AMOSTRA	DESCRIÇÃO
	<p>Preparo do tampão de lise.</p>
	<p>a) "Regrow" (35⁰C/3h) b) Preparo para lise: 5µl do "Regrow" transferido para 200µl do tampão de lise.</p>
	<p>Bloco aquecedor para extração do DNA genômico: a) 35⁰C/20min. b) 95⁰C/10min.</p>
	<p>Bloco de resfriamento (5min).</p>
	<p>O lisado é colocado nos tubos Eppendorf, contendo os tabletes com os primers, nucleotídeos e Taq DNA polimerase.</p>
	<p>Colocação das tampas ópticas</p>
	<p>Colocação das amostras no termociclador (até 96 tubos simultaneamente) e início da amplificação do DNA genômico. Ao final, observar na tela as amostras positivas e negativas.</p>

Quando ocorre a amplificação, o corante SYBR® GREEN emite um sinal fluorescente na presença do DNA, que é detectado por lâmpadas de diodo, dispostas para cada tubo de amostra analisada (96 ao todo). Esta excitação fluorescente é captada e registrada pelo software (figura 9). No caso de ausência de *Salmonella*, não ocorrerá a emissão do sinal fluorescente pelo SYBR® GREEN. O mecanismo de ligação com o ácido nucléico ainda não é conhecido, porém tem demonstrado ser eficiente e estável dentro do processo de detecção por PCR (WITTEWER, et al., 1997; SINGER, et al., 1999).

Os resultados são apresentados pelo software como mostra o quadro 9. Os círculos em verde são resultados negativos e em vermelho positivo. O software também detalha os resultados em gráficos onde nas ordenadas são descritas as temperaturas de análise e nas abscissas a absorbância (baseada na fluorescência).

Os pontos críticos de todo este processo são basicamente três, sendo um a transferência de volumes, já que trabalha-se com quantidades muito pequenas de amostra. Os outros dois parâmetros críticos são o tempo e a temperatura, principalmente durante a fase de lise e resfriamento e logo após a hidratação dos tabletes com a amostra lisada na entrada do termociclador.

Os gráficos são interpretados como positivos quando aparecem picos dos alvos, dentro de uma faixa de variação específica de temperatura para o patógeno alvo. Em reações positivas fortes, os picos podem mudar para temperaturas ligeiramente mais baixas, e em reações mais fracas, os positivos podem mudar para temperaturas mais altas. Quando da ausência do DNA alvo, visualizam-se os picos de controle nas temperaturas entre 78 e 80⁰C. Quando se tem a presença do DNA alvo, este pico de controle pode diminuir em intensidade (altura do pico) e dependendo da presença do alvo em níveis elevados pode ser muito pequeno ou até mesmo ausente, pois ocorre o total consumo dos reagentes e forte sinal fluorescente.

Optical Layout of the Detection System

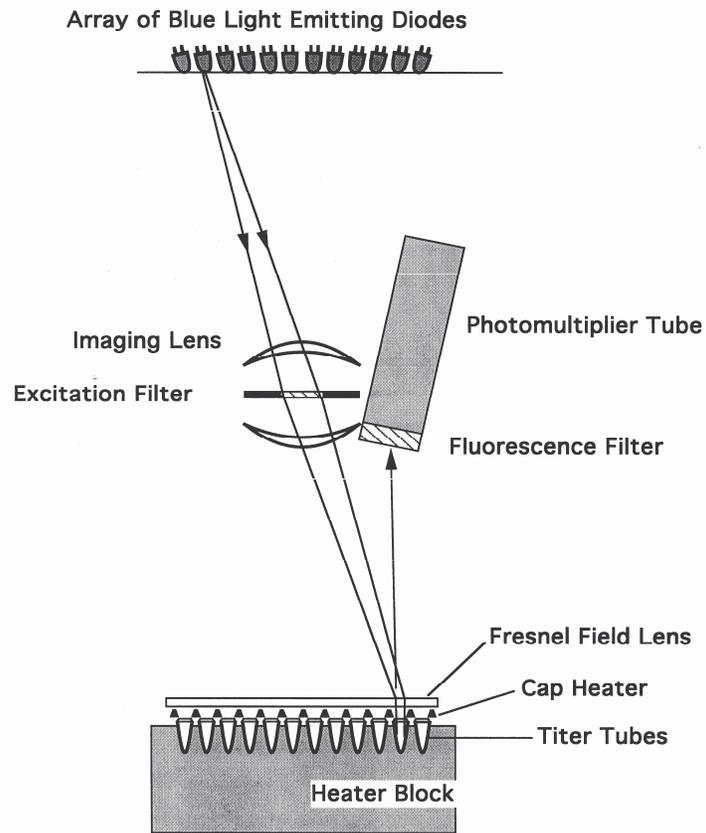
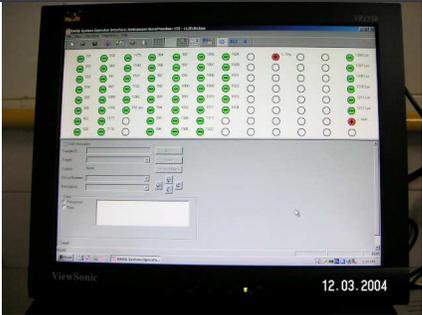
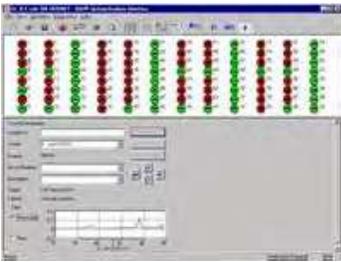


Figura 9: Emissão do sinal de fluorescência em presença do DNA genômico

Quadro 9: Resultados da análise: A – BAX System®.

RESULTADOS	DESCRIÇÃO
	<p>Resultado da análise na tela do computador.</p>
<p>  Verde (-) = Negativo para organismo alvo.  Vermelho (+) = Positivo para organismo alvo  Amarelo (?) = Resultado indeterminado.  Amarelo (?) com faixa vermelha = Erro de sinal. </p>	<p>Interpretação dos resultados.</p> 

Perfil da Curva de fusão para *Salmonella* Positivo (quadro 10)
(DUPONT/QUALICON, 2005):

- Três picos de alvo a 85, 88 e 90°C. A temperatura pode variar de 84 para 92°C.
- Aproximadamente 5°C de distância entre o primeiro e o terceiro pico.
- Quando o nível de *Salmonella* numa amostra é muito alto, os picos a 88 e 90°C podem se fundir, formando apenas dois picos distintos. Neste caso, o pico fundido é muito grande e o pico de controle será muito pequeno ou ausente.

Quadro 10: Perfil da Curva de fusão para *Salmonella*.

RESULTADOS	DESCRIÇÃO
	Forte <i>Salmonella</i> positivo
	Forte <i>Salmonella</i> positivo, com picos fundidos
	Moderado <i>Salmonella</i> positivo
	Fraco <i>Salmonella</i> positivo
	<i>Salmonella</i> negativo

2.4. Comparativo entre os diferentes métodos.

O **método cultural tradicional** utiliza-se de provas sorológicas e bioquímicas que, com certa precisão, permitem diferenciar *Salmonella* dos demais microrganismos. A maioria dos métodos alternativos recorre aos mesmos testes em caso de suspeita da presença de *Salmonella*. Devido ao fato de que pelo menos duas colônias suspeitas de cada placa contendo o meio seletivo diferencial devem ser avaliadas, a técnica torna-se trabalhosa e sujeita aos erros de manipulação e interpretação de resultados.

Um fato muito conhecido em laboratórios que fazem análise de *Salmonella* rotineiramente reside na similaridade com outras cepas de *Enterobacteriaceae* nas reações bioquímicas, particularmente *Citrobacter* sp, levando as análises até a prova com API 20E, para confirmação da identidade, retardando a liberação de laudos. BENNET et al. (1999) propuseram o uso da enzima pirrolidonil peptidase

para diferenciar estas cepas, já que várias *Enterobacteriaceae* são positivas enquanto *Salmonella* é negativa. A proposta mostra-se bastante interessante, já que consegue eliminar uma porcentagem dos microrganismos não *Salmonella*, porém algumas *Enterobacteriaceae* não apresentam resultado positivo quanto à produção desta enzima, levando, de qualquer forma, à necessidade de confirmação até as etapas finais.

A **técnica de PCR** é considerada definitiva, pois está baseada na amplificação de regiões específicas do DNA do patógeno, que é exclusiva, não exigindo confirmação posterior. No entanto, é um método delicado, exigindo cuidado no preparo das soluções, na manipulação e na estocagem. O protocolo segue várias etapas de transferência de volumes, onde há o risco de contaminação das moléculas amplificadas (HOCHBERG et al., 2001). Quando se faz a avaliação de uma cepa pura, a margem de confiança no método é extremamente elevada, mas quando se trata de analisar amostras de alimentos, a presença de inibidores pode prejudicar a ligação dos “primers” ao “template” ou reduzir a eficiência da amplificação (FDA, 2001). Assim, na teoria uma amostra poderia ser analisada diretamente do alimento, porém na prática existe a necessidade de etapas de enriquecimento, como é o caso da maioria dos métodos alternativos.

O **sistema BAX®** é o único sistema automatizado de detecção de bactérias patogênicas em alimentos baseado no DNA. Reduz os problemas de contaminação, já que reúne, em um único tablete estável, os reagentes necessários para o PCR, protegido dentro dos tubos de análise, além de reduzir o potencial de erros causados pelo operador técnico. Permite a análise simultânea de 96 amostras para uma mesma bactéria alvo, ou análises simultâneas para dois ou mais patógenos ao mesmo tempo, já que os “primers” são específicos para cada um deles. Através do software tem-se também eliminadas as fases de eletroforese em gel e documentação fotográfica (DUPONT, 2005). As vantagens e desvantagens dos métodos descritos são listadas neste tópico, conforme apresentado pelo quadro 11:

Quadro 11: Comparação entre os diferentes métodos de análise de *Salmonella* em Alimentos.

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
TRADICIONAL	<ul style="list-style-type: none"> • Testes baseados em provas bioquímicas e sorológicas, característico para cada gênero ou espécie. • Só detecta células viáveis, indicando potencial de toxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Várias etapas de análise lentas e trabalhosas. • Necessitam de pré-enriquecimento antes das análises, além de vários isolamentos. • Erros de interpretação. • Algumas cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> podem apresentar resultados muito próximos dos obtidos para <i>Salmonella</i>, exigindo continuação das análises até as últimas etapas. • Possibilidades de reações cruzadas nos testes sorológicos.
PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção definitiva • Reprodutibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Complexidade dos procedimentos. • Necessitam de pré-enriquecimento antes das análises. • Potencial para falsos positivos, devido a contaminação, durante as várias pipetagens.
BAX	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção rápida e definitiva. • Automação. • Evita problemas de contaminação cruzada • Permite análise simultânea de 96 amostras. • Reagentes prontos. • Reprodutibilidade. • Após o enriquecimento, não necessita de etapas de isolamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Metodologia cara (equipamento e “kits” de análise). • Necessitam de pré-enriquecimento antes das análises. • Detecta células mortas
OUTROS MÉTODOS RÁPIDOS	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliam um alvo específico e característico da espécie. • Rapidez e análises de várias amostras ao mesmo tempo em um período de tempo relativamente curto. • Resultados negativos permitem a emissão rápida de laudos. 	<ul style="list-style-type: none"> • A maioria dá respostas positivas apenas presuntivas, necessitando recorrer ao método tradicional. • Necessitam de pré-enriquecimento antes das análises. • Alguns apresentam limitações a certos tipos de alimentos. • Os métodos baseados na reação antígeno/anticorpo flagelar apresentam limitação para análise de <i>Salmonella</i> imóvel.

2.5. Impacto que os métodos rápidos exercem sobre a saúde pública e economia no país

Os problemas econômicos e emocionais gerados por um distúrbio gastrointestinal representam um importante aspecto que deve ser considerado. Nos EUA estima-se que são gastos cerca de US\$ 700 para cada caso de *Salmonella* em seres humanos. Já na União Européia são gastos anualmente cerca de 2,8 bilhões de Euros entre prevenção, controle e cuidados com pacientes infectados (SUINOCULTURA INDUSTRIAL, 2005).

Salmonella, apesar da possibilidade de estar presente em vários tipos de alimentos, tem sido de certa forma associada aos produtos avícolas (carne de frango, ovos, etc.) com uma maior escala. NASCIMENTO e PONTES (2004) ressaltam que a indústria avícola brasileira é uma das maiores produtoras e exportadoras mundiais de carne de frango. Segundo dados da ABEF (Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango) a receita na exportação somente em fevereiro de 2005 atingiu a cifra de US\$ 219 milhões, ficando em segundo lugar no ranking de exportação entre todos os produtos brasileiros. Desde o ano de 2000 o Brasil é mundialmente o segundo país exportador de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos.

Em relação à carne suína o Brasil também vem alcançando importante espaço na exportação mundial. Segundo a ABIPECS (Associação Brasileira das Indústrias Produtoras e Exportadoras de Carne Suína), em janeiro de 2005 foram exportadas 37 mil toneladas, o equivalente a US\$ 68 milhões, tendo um crescimento de 153% em relação ao mesmo período de 2004, ficando em quarto lugar no ranking dos países exportadores de carne suína desde 2001. A carne e derivados de suínos, também são considerados importantes veículos de *Salmonella*, sendo superados apenas pelos produtos avícolas (BERSOT, 2004). São importantes neste setor a *Salmonella* Typhimurium que pode causar enterocolite ou distúrbio digestivo levando a uma redução do desempenho animal

e *Salmonella Choleraesuis* que pode levar a infecção generalizada, acarretando altos índices de mortalidade entre os animais.

Tanto na suinocultura como na avicultura tem-se utilizado cada vez mais o sistema de criação intensivo, ou seja, sob confinamento fica mais fácil o controle, aumentando a produção, porém este sistema tem acarretado uma maior facilidade de disseminação de patógenos, levando a possíveis contaminações das carcaças durante o abate e processamento, mortalidade entre os animais, ou transmissão ao ser humano (BERSOT, 2004). Este autor ressalta que vários estudos têm determinado a prevalência de *Salmonella* nas granjas produtoras tanto no Brasil como no exterior, indicando a possibilidade de que a contaminação possa acontecer por esta rota.

A importância da qualidade de carnes, em todos os aspectos, inclusive o microbiológico (questões de biossegurança) deve ser enfatizado em todos os segmentos da cadeia produtiva, de forma a se adequar às exigências dos consumidores internos e pré-requisitos dos países importadores (MELLO JÚNIOR, 2004). Vale ressaltar que o brasileiro de uma forma geral tem-se preocupado muito mais com a qualidade dos produtos que consome. Desta forma, vemos a importância que estes produtos têm na economia brasileira e a necessidade da manutenção da qualidade através de rastreamento rápido e eficiente, garantindo assim à confiabilidade de outros países, exigindo rapidez nas análises microbiológicas durante todas as etapas de produção.

A indústria avícola tem comprovado que a utilização de métodos rápidos, principalmente a técnica de PCR, torna ágil o rastreamento, além de promover um grau de sensibilidade maior que o método tradicional dentro de sua proposta, em busca da detecção das principais linhagens importantes para o setor avícola (*S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) (NASCIMENTO e PONTES, 2004).

Os alimentos em geral, quer sejam processados, semiprocessados ou hortifrutis devem ser monitorados constantemente a fim de evitar problemas de

contaminação, que podem ocorrer antes ou durante o processamento, durante o plantio e desenvolvimento no campo, através de água contaminada e na pós-colheita.

Para o desenvolvimento do presente trabalho de tese, dentro do rol de alimentos analisados, foram avaliadas amostras de refeições servidas em restaurantes populares, além de amostras de caqui, visando um monitoramento de campo do plantio e pós-colheita, assim como amostras de peixes "in natura", visando obter um diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária sob o ponto de vista microbiológico. Reflete-se aqui a agilidade nas análises, através da proposta de utilização de métodos rápidos, especificamente o sistema BAX na análise de *Salmonella*.

No Brasil já temos alguns laboratórios de análise de alimentos que utilizam o sistema BAX®, além de vários grandes frigoríficos no Estado de São Paulo que exportam seus produtos e, portanto, necessitam de respostas rápidas quanto à avaliação da inocuidade de seus produtos.

Uma grande restrição quanto à aquisição deste equipamento reside no valor do investimento, porém deve ser considerada a inter-relação entre os fatores custo x benefício, desde que sejam laboratórios que trabalhem rotineiramente com muitas análises de *Salmonella*, lembrando que o equipamento permite analisar também outros patógenos de importância em alimentos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Listeria* sp, *Enterobacter sakazaki*, e *Campylobacter* sp, com possibilidade de expansão no leque de microrganismos a serem avaliados.

CAPÍTULO 3:

O processo de validação de métodos microbiológicos

3. O processo de validação de métodos microbiológicos

3.1. Questões de qualidade em laboratórios de análises de alimentos.

A padronização de métodos e análises torna-se cada vez mais necessária, de forma a garantir a confiabilidade global. O controle de qualidade em laboratórios de análises de alimentos envolve procedimentos, metodologia, medição, rastreabilidade, entre outros, com todas as ações comprovadas e documentadas.

Por muito tempo, os métodos de detecção de *Salmonella* em alimentos foram conduzidos de forma independente tanto nos EUA como na União Europeia (UE). Os EUA utilizam a metodologia cultural oficial da AOAC, enquanto a UE segue o método cultural determinado pela ISO 6.579:2002, que apesar de similares nos procedimentos básicos, possuem diferenças nos meios e condições de incubação (FELDSINE et al., 2003). FELDSINE et al. trabalharam em um estudo colaborativo de validação de ambos os métodos, já que o comércio internacional e a necessidade de trocas de informações, principalmente em casos de surtos, exigem que eles possam ser padronizados e comparativos.

HONSA e MCINTYRE (2003) discorrem sobre os benefícios práticos da implantação de um sistema de qualidade na prática laboratorial, sendo estes sistemas a certificação pela ISO 9001:2000 e credenciamento pela ISO/IEC 17.025:2001, que envolve desde o treinamento de pessoal, desenvolvimento de métodos, validação de procedimentos, calibração e determinação de incertezas de equipamentos, além de um programa de manutenção da qualidade adquirida. A implantação de um programa de monitoramento rigoroso e controle da documentação permitem ações corretivas, preventivas e monitoramento de não conformidades, ressaltam os autores.

Desde os anos 50 muito se tem falado a respeito da Qualidade total e mais recentemente sobre Sistemas de Qualidade. Com a globalização o intercâmbio de

produtos, informações e experiências têm tornado cada vez mais freqüente a exigência, tanto do mercado interno quanto externo, em relação às características de qualidade de um produto, além da agilidade na comprovação e emissão de laudos desta qualidade atingida. Desta forma não só o setor produtivo tem a obrigação de padronização e melhoria contínua de seus produtos e serviços, como também os setores de análise destes produtos, como o caso de um laboratório de análise microbiológica de alimentos, responsável pela avaliação da qualidade e biossegurança do alimento.

A padronização de produtos e serviços permite um consenso interno e externo ao país, permitindo critérios consistentes na classificação de produtos, em ensaios e análises, na terminologia e provisão de serviços (ISO, 2005).

Dentro das ferramentas disponíveis para implantação da qualidade em laboratórios de análises de alimentos temos a série da ISO 9000, que padroniza ações administrativas em geral, através de certificação de órgãos reconhecidos internacionalmente, podendo ser utilizada por qualquer organização; a ISO 17.025, que padroniza as competências de laboratórios de ensaios e calibrações, através de credenciamento que qualifica o laboratório em suas análises (DRAKE, 2003); e sem poder deixar de comentar, as Boas Práticas Laboratoriais (BPL) fundamentais para atingir o grau de confiança exigido. O credenciamento nada mais é do que a avaliação da competência de um laboratório na realização das análises e estudos por ele proposto (BRASIL, 1997).

Dentro deste processo de qualidade é importante a validação de métodos, que é a comprovação de sua eficiência e eficácia através de testes e procedimentos, documentando-se todos os passos, tornando um produto, equipamento ou metodologia confiável. Para tanto, é necessário ter pessoal altamente qualificado, além, é óbvio, de dedicação e empenho em seu trabalho. A participação e colaboração de todos são extremamente importantes para que este processo de implantação torne-se viável. Considerando, então, que o sucesso de qualquer empreendimento está diretamente relacionado à equipe de colaboradores internos, independente do setor de atuação, são necessários

programas de treinamentos e atualizações constantes, devendo sempre ser consideradas formas de motivação pessoal, sendo este o primeiro passo no processo de implantação de um sistema de qualidade.

3.2. Sistemas da qualidade para laboratórios de análises

Com a Globalização, muito se tem falado sobre questões de qualidade total e como não poderia deixar de ser, os laboratórios de análise também têm buscado implementar essa política de melhoria contínua. Dentro deste sistema podemos falar das Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e a ISO 17025, baseados em ações e procedimentos documentados que permitem o reconhecimento nacional e internacional do laboratório.

Neste processo de melhoria contínua, os laboratórios chegam a níveis operacionais satisfatórios, levando a uma maior credibilidade nas análises laboratoriais.

Todo o processo é trabalhoso, exigindo colaboração e o comprometimento de todas as pessoas envolvidas, incluindo a gerência.

No Brasil o credenciamento é regulamentado pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) através do INMETRO. Diretrizes básicas para o credenciamento de laboratórios são fornecidos pelo INMETRO, dentro das quais destacam-se DOQ-CGCRE-001 (orientações para o credenciamento), DOC-CGCRE-002 (realizações de auditorias), DOC-CGCRE-003 (calibrações de equipamentos e DOC-CGCRE-008 (validações de métodos de ensaios químicos), este último, objeto do presente estudo.

Através da Norma NIT-DICLA-026 tem-se os requisitos para a participação dos laboratórios de ensaios em atividades de proficiência, cujos benefícios podem ser citados a comparação regular de seu desempenho com outros laboratórios credenciados e informações sobre as características de desempenho de métodos analíticos. Para tanto é necessário que o laboratório demonstre possuir o nível de

competência técnica necessária, tais como controle interno de qualidade, uso regular de materiais de referência, repetição de ensaios e correlação de resultados, entre outros.

3.2.1. Boas Práticas Laboratoriais (BPL)

Os princípios de Boas Práticas Laboratoriais (BPL) têm sido desenvolvidos para promover a qualidade e validade de análises realizadas em laboratórios, de forma a atingir uma padronização em questões de planejamento, segurança, procedimentos, metodologia, e que estas análises possam ser realizadas por diferentes pessoas e em diferentes locais, obtendo-se os mesmos resultados, pois apesar destas variáveis, ainda continua sendo uma única análise e um único estudo (LOCO et al, 2003). Não havendo um planejamento cuidadoso, padronização e comunicação, o risco de se obter resultados diferentes é muito grande. Todos os procedimentos realizados devem ser documentados, relatados e arquivados.

Organizações como FDA (Food and Drug Administration), EPA (Environmental Protection Administration) e OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) definiram princípios para BPL com o objetivo de padronizar uma linguagem entre países por ocasião de trocas de informações e desenvolvimento de uma estrutura laboratorial objetivando dados de alta qualidade e confiabilidade (FDA, 2004; LARSEN, 2002). As duas primeiras organizações estão sediadas nos Estados Unidos, enquanto a OECD é uma organização intergovernamental representativa de cerca de 30 países industrializados, entre eles Austrália, Bélgica, Canadá, Dinamarca, República Federal Alemã, Finlândia, França, Itália, Japão, Noruega, Países Baixos, Portugal, Espanha, Suécia, Suíça, Reino Unido, Estados Unidos, além da participação da ISO (International Organization for Standardization) e WHO (World Health Organization), sediada em Paris, França (OECD, 1995). Uma tabela de

comparações entre os procedimentos para BPL adotados pelos três órgãos foi desenvolvida pelo FDA em 2004, com inúmeras concordâncias em suas diretrizes.

Os objetivos da implantação das BPL compreendem a obtenção de uma estrutura laboratorial mais sólida, elevação da qualidade, confiabilidade internacional, padronização de testes laboratoriais, maior eficácia nas análises, além de um controle efetivo sobre a qualidade atingida.

No Japão as BPL começaram a ser implantadas a partir de 1983, por força do intercâmbio entre países seguindo basicamente as recomendações estabelecidas pela FDA, e desde então tem-se observado uma queda em resultados discordantes neste país (Iwaoka, 1997).

No Brasil o órgão regulador nacional é o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia) (Brasil, 1973 e 1999). O Brasil basicamente apóia-se nas diretrizes estabelecidas pela OECD, através do documento “OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring”, que é revisado periodicamente. A partir de 1995 foi publicado pelo INMETRO documento estabelecendo propostas de ações a serem desenvolvidas visando o reconhecimento mútuo, entre o Brasil e os países da OECD, de análises laboratoriais para serem realizadas de acordo com as Boas Práticas de Laboratórios.

3.2.2. ISO/IEC 17025:2001

A ISO/IEC 17025:2001 é uma norma internacional que define as regras gerais para a competência dos laboratórios de ensaio e calibração e foi desenvolvida com a proposta de padronização internacional de normas e procedimentos laboratoriais.

A elaboração da ISO/IEC 17025:2001 começou em 1993 com a International Organization for Standardization (ISO) em conjunto com CASCO (Comitee on Conformity Assessment), cujo objetivo inicial era padronizar a

linguagem falada entre a norma ISO/IEC Guide 25 e a norma europeia EN 455.001:1989 utilizadas até então. Com o trabalho conjunto entre a ISO e a International Electrotechnical Commission (IEC) seus termos foram finalizados e aprovados em 1999. A trajetória seguida para a elaboração desta norma pode ser lida nos trabalhos de KOHL, 1998 e LEEMPUT, 2000.

Alguma confusão ainda existe a respeito de certificação e credenciamento. O credenciamento é obtido através da implantação do sistema de qualidade padronizado pela ISO/IEC 17025:2001, norma específica para laboratórios de ensaio e calibração. Este sistema engloba tanto as exigências administrativas, quanto as técnicas, avaliando a competência de um laboratório em conduzir análises, medidas e calibrações. Já a certificação é obtida através da ISO 9000 (ISO 9001:2000 e ISO 9002:2000) que é um reconhecimento para um padrão de qualidade administrativa, podendo ser utilizado por qualquer organização, independente da atividade, garantindo que um produto oferecido segue um padrão de qualidade, satisfazendo o cliente final (DRAKE, 2003). A ISO 17025 está em conformidade com as exigências da ISO 9000, mas o oposto não é verdadeiro (VALLE, 2004).

A realização de análises em um laboratório credenciado pela ISO/IEC 17025:2001 permite que a emissão de laudos tenha confiabilidade assegurada e reconhecimento em mais de 30 países.

Analisando as propostas da ISO/IEC 17025:2001 e das BPL, podemos observar que BPL é um sistema de qualidade que diz respeito à organização em que um teste é planejado, conduzido, monitorado e registrado, além da divulgação do mesmo, seguindo um protocolo com objetivos, propostas, método e análise. Segue um procedimento operacional padrão, os chamados SOPs (Standard Operating Procedures), de forma a garantir a qualidade e integridade dos dados, não sendo necessariamente métodos validados, mas métodos em estudo ou conduzindo um estudo e de forma a assegurar uma prática operacional consistente. Já a ISO/IEC 17025:2001 tem enfoque sobre os procedimentos laboratoriais gerais, seguindo métodos de análise protocolados e validados

internacionalmente e através da utilização de equipamentos e procedimentos confiáveis.

Requisitos essenciais e exigidos para a certificação de um laboratório envolvem avaliações periódicas denominadas de teste de proficiência, auditoria interna e auditoria externa.

As auditorias estão regulamentadas através de normas de procedimentos pela “ABNT NBR ISO 19011:2002 – Diretrizes para auditoria de sistema de gestão da qualidade e/ou ambiental”, a qual estabelece os princípios básicos, critérios e práticas de uma auditoria e fornece as diretrizes para instituir, planejar, executar e documentar as auditorias de sistemas da qualidade, bem como fornece orientações para a competência e avaliação de auditores, sendo uma exigência do INMETRO para os laboratórios credenciados.

Devem ser realizados também programas interlaboratoriais, que são utilizados pelos responsáveis por laboratórios com o intuito de avaliar resultados de medições visando a sua melhoria contínua, obtendo assim a confiabilidade nos resultados dos ensaios e das calibrações. Estes programas são baseados em conceitos estatísticos, e também é uma exigência do INMETRO para credenciamento de laboratórios.

Para a averiguação e monitoramento contínuo do desempenho do laboratório credenciado são realizados testes de proficiência, através de comparações interlaboratoriais, estudo este conduzido sob sigilo absoluto, mantendo assim a integridade dos laboratórios. Nestes testes são comparadas a precisão e exatidão dos resultados, as metodologias utilizadas, avaliadas as habilidades do laboratório em realizar os ensaios, além de estabelecer um programa de controle de qualidade permanente, fornecendo ao mesmo tempo uma medida para o próprio laboratório manter sua qualidade, através de avaliações externas. Os procedimentos para a realização destes testes de proficiência estão especificados pela Guia 43-1, ABNT/INMETRO de 1999.

Os laboratórios, quando submetidos aos testes de proficiência, podem estar sujeitos a uma performance insatisfatória devido a uma série de fatores, sendo duas as causas principais: primeiro, são as falhas nos procedimentos operacionais padrão, entre estes, erros de diluições, erros de amostragem, interpretações errôneas do funcionamento de equipamentos e, segundo, os erros analíticos, freqüentemente causados por variações na calibração de materiais de laboratório ou de equipamentos. Quando ocorre alguma destas não conformidades, o laboratório tem a oportunidade de avaliar a rotina das análises, detectando os procedimentos inadequados, levando a uma melhoria contínua da qualidade (JENNY & TARENTINO, 2000).

Como observado por DREAZEN (2004) o processo de amostragem também contribui para a validação ou incerteza de um resultado, ou seja, quanto melhor e mais eficiente for a amostragem, tanto melhor será o resultado da análise. A maioria dos laboratórios não está envolvida na amostragem, ficando ao encargo do cliente interessado. Desta forma a transparência da forma de ação do laboratório deve ser a maior possível, evitando interpretações errôneas por parte do cliente.

As experiências práticas com a implantação da ISO/IEC 17025 têm sido relatadas. Na Europa como um todo, o processo de implantação da política de qualidade não tem demonstrado problemas significantes. (FORSTEN, 2002). PRITZKOW (2003) do DAR (Deutscher Akkreditierungsrat), órgão de acreditação da Alemanha, relata que não tem encontrado problemas sérios na implantação deste sistema de qualidade, apenas descrevendo pequenas ocorrências comuns, tais como dificuldades na medida da incerteza de testes e equipamentos, ou problemas com aquisição de serviços e suplementos, cujos fornecedores também devem ter uma política de qualidade implementada, problemas estes passíveis de resolução na maioria das vezes através das diretrizes estabelecidas pelas guias de implementação.

3.3. Processo de implantação da ISO/IEC 17025:2001

3.3.1. Estrutura hierárquica dentro do credenciamento (INMETRO, 2005; VALLE, 2004; INMETRO/CGCRE, 2003)

Organismos de credenciamento internacionais:

- **ILAC** (International Laboratory Accreditation Cooperation) é um organismo de cooperação internacional que reúne os órgãos de credenciamento de todo o mundo, sendo que o INMETRO é membro desta associação.
- **EA** (European Co-Operation for Accreditation) é um organismo de cooperação para credenciamento de laboratórios e organismos de certificação e inspeção da Comunidade Européia.
- **IAAC** (Interamerican Accreditation Cooperation) é um organismo de cooperação das Américas com um total de 34 organismos membros dos países da América Latina, Estados Unidos e Canadá. Atualmente 4 organismos de acreditação são signatários do MLA (Multilateral Recognition Arrangements) da IAAC: **Inmetro** (Brasil), nas áreas de Laboratórios de Ensaio e Calibração e Sistemas de Gestão da Qualidade; a American Association for Laboratory Accreditation - **A2LA** (Estados Unidos), na área de Laboratórios; Standards Council of Canada - **SCC** (Canadá), nas áreas de Laboratórios e Sistemas de Gestão da Qualidade; e a Entidad Mexicana de Acreditación - **EMA**, na área de Sistemas de Gestão da Qualidade.

Hierarquia a nível nacional:

- **MDIC** (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior). Criado pela Medida Provisória nº 1.911-8, de 29/07/1999 - DOU 30/07/1999, tendo como área de competência a política de desenvolvimento da indústria, do comércio e dos serviços; propriedade intelectual e transferência de tecnologia; metrologia, normalização e qualidade industrial; políticas de comércio exterior; regulamentação e execução dos programas e atividades relativas ao comércio exterior; aplicação dos mecanismos de defesa comercial; participação em negociações internacionais relativas ao comércio exterior; formulação da política de apoio à microempresa, empresa de pequeno porte e artesanato e execução das atividades de registro do comércio (MDIC, 2005).
- **SINMETRO** (Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). É um sistema brasileiro constituído por entidades públicas e privadas, instituído pela lei 5.966/73 para criar uma infra-estrutura de serviços tecnológicos capaz de avaliar e certificar a qualidade de produtos, processos e serviços por meio de organismos de certificação, rede de laboratórios de ensaio e de calibração, organismos de treinamento, organismos de ensaios de proficiência e organismos de inspeção, todos credenciados pelo INMETRO.
- **INMETRO** (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), como descrito no item 3.2.1, foi criado pela lei nº 5.966/73, complementada pela lei nº 9.933/99, podendo credenciar entidades públicas ou privadas para execução de atividades de sua competência. É o órgão executivo do SINMETRO e está vinculado ao MDIC.

- **CGCRE** (Coordenação Geral de Credenciamento), através do Decreto nº 4.039/2001, tem a competência para atuar como órgão credenciador de laboratórios de calibração e ensaios. Faz parte da estrutura organizacional do INMETRO. A CGCRE/INMETRO tem um acordo bilateral de reconhecimento mútuo com a ILAC, EA e IAAC.
- **DICLA** (Divisão de Credenciamento de Laboratórios) é a divisão responsável pela coordenação, gerenciamento e execução de todas as fases das atividades de credenciamento e contatos com os laboratórios de calibração e ensaios. Está vinculada à CGCRE por intermédio da Portaria nº 32/2002.

3.3.2. Processo para o credenciamento (INMETRO, 2005; INMETRO/CGCRE, 2003)

O credenciamento é a formalização oficial da competência de um laboratório para a realização de suas atividades. As diretrizes são estabelecidas pela ILAC e BPL/OECD. O credenciamento em si favorece as relações internacionais através da aceitação dos certificados e laudos emitidos pelo laboratório, além de uma maior confiança por parte dos solicitantes das análises.

O processo de implantação deste sistema de qualidade é bem orientado através do documento DOQ-CGRE-001 (INMETRO/CGCRE, 2003).

As fases da implantação acontecem segundo o fluxograma apresentado na figura 10 (INMETRO, 2005).

A elaboração de um Manual da Qualidade é importante para a definição do sistema de gestão da qualidade do laboratório, definindo claramente políticas, procedimentos e responsabilidades.

O laboratório deve ter em mãos os certificados de calibração dos equipamentos utilizados, os procedimentos detalhados dos ensaios, estimativas

das incertezas de medição, uma relação dos padrões utilizados como referência, além dos equipamentos e materiais de referência, iniciando assim a solicitação do credenciamento.

Uma visita preliminar de avaliação tem o objetivo de verificar a adequação do espaço, equipamentos, bancadas, condições ambientais, fornecer sugestões para adequação de possíveis não conformidades, esclarecimento de dúvidas quanto ao processo e conhecimento da gerência técnica, gerência da qualidade e técnicos do laboratório.

Os documentos encaminhados são analisados cuidadosamente, são avaliados os requisitos da gerência e são analisados os requisitos técnicos.

São realizadas comparações interlaboratoriais e ensaios de proficiência, objetivando demonstrar a competência do laboratório nos ensaios requisitados ao credenciamento.

Uma avaliação inicial é realizada por uma equipe de avaliadores nas instalações do laboratório solicitante, verificando se a implantação do Sistema de Qualidade estabelecido dentro do Manual da Qualidade é efetivo, além da competência técnica na realização das análises, através de sua demonstração prática. Também são avaliados os procedimentos e registros, equipamentos, programa de calibração, instalações e condições ambientais, existência de auditorias internas, treinamentos de pessoal e a própria equipe de trabalho, como são tratadas as não conformidades, competência dos responsáveis por aprovar o conteúdo técnico dos laudos, além da capacidade de realizar ensaios e medições rastreáveis a nível nacional. Ao final, o resultado da auditoria é apresentada a toda a gerência do laboratório, e em caso de não constatação de não conformidades o credenciamento pode ser imediato, ou caso contrário, é dado prazo para que sejam eliminadas as não conformidades, através de medidas corretivas e realização de nova auditoria.

Após a obtenção do credenciamento, anualmente realizam-se vistorias de supervisão durante três anos consecutivos e uma reavaliação no quarto ano a

partir da avaliação inicial e assim sucessivamente para a manutenção do credenciamento.

3.4. Importância da validação de novos métodos na qualidade das análises laboratoriais.

Um dos aspectos importante que um laboratório que se propõe a trabalhar dentro de um padrão de qualidade reside na escolha de um método aceito e validado internacionalmente, que tenha suficiente apoio através da literatura e de protocolos comprovando sua precisão (COSTA, 2004). A validação de métodos de análises tem importância na conformidade com a legislação, no controle da importação/exportação, na manutenção da qualidade e controle do processo em laboratórios acreditados e instituições de pesquisa (LAUWAARS, 1998).

HOLMGREN, em 1998, através da conexão entre EAL (European Co-Operation for Accreditation of Laboratories) e a EUROLAB, órgãos de credenciamento europeus, apresentou um documento padronizando definições relativas à validação de métodos, sendo então descrita como “uma forma de demonstrar que um método é conveniente à finalidade a que se propõe, incluindo uma avaliação e um balanço das possibilidades tecnológicas, custos e riscos”. A definição utilizada no Brasil é “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO/CGRE (2), 2003).



Figura 10: Fluxograma do processo de implantação da ISO/IEC 17025 (INMETRO, 2005).

Em um processo de validação é importante estimar a representatividade, exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade do método, demonstrando que este pode ser utilizado com segurança na divulgação de um resultado (LAUWAARS & ANKLAN, 2004), principalmente quando envolve aspectos de saúde pública. Um laboratório que realiza monitoramento ou avaliações de riscos deve necessariamente validar os métodos utilizados em suas análises. A credibilidade internacional, assim como a dos consumidores em geral, também está atrelada à confiabilidade da metodologia empregada.

Os principais fatores que podem afetar o resultado de uma análise são: a amostragem, a homogeneidade, o método utilizado, o equipamento, o ambiente de teste e o fator humano (HOLMGREN, 1998). Quando se trata de novos métodos estas influências e incertezas ainda não estão bem estabelecidas. Nisto reside a importância na validação quando se fala da utilização de novos métodos, métodos utilizados por vários laboratórios, modificação de métodos e métodos padronizados e sua adequação de uso pelo laboratório.

Uma validação pode ser interna, ou seja, o laboratório valida um método através de amostras internas, comprovando sua confiabilidade de aplicação, ou participa de estudos colaborativos, num processo de validação interlaboratorial, onde dados de vários laboratórios são avaliados em conjunto, como no caso do processo de validação do sistema BAX®, para oficialização do uso do equipamento no Brasil.

Tanto o laboratório como os órgãos de credenciamento tem interesse em estabelecer procedimentos adequados ao processo de validação, incluindo a metodologia, planejamento e controle do teste. A validação pode então acontecer de duas formas básicas: como um estudo do desempenho de um método, demonstrando a representatividade, repetibilidade e reprodutibilidade do método em relação a diferentes aspectos, demonstrando que os fatores que o afetam foram avaliados e controlados dentro de uma medida de incerteza; ou como um

estudo comparativo com um método de referência validado, desde que ambos tenham a mesma proposta (HOLMGREN, 1998).

Outro parâmetro importante na confiabilidade de um resultado diz respeito à estimativa da incerteza de um método, que é extremamente útil na avaliação de seu desempenho, influenciando a validação do mesmo. De acordo com a ISO (“Guide to the expression of uncertainty in measurement”, 1993) a medida da incerteza é definida como “um parâmetro associado com o resultado de uma medida, que caracteriza a dispersão dos valores que pode razoavelmente ser atribuído à própria medição. Este parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão ou a metade de um intervalo dentro de um nível de confiança” (ELLISON & WILLIAMS, 1998). Sempre haverá uma incerteza em torno de um resultado e mesmo que todas as medidas corretivas relacionadas com os fatores responsáveis por esta incerteza tenham sido tomadas, ainda assim haverá incertezas em relação às correções adotadas e variações aleatórias do próprio resultado (ELLISON & WILLIAMS, 1998). WILLIAMS (1996) já chamava a atenção para este fato, no sentido de que sem a estimativa da incerteza é impossível avaliar a confiabilidade de um resultado e a certeza que pode ser depositada em uma decisão baseada no mesmo. KRAGTEN (1994) apresenta um trabalho para cálculos de desvio padrão e intervalo de confiança aplicável a diversas áreas.

No Brasil o processo de validação e documentação da mesma têm a orientação dada através da guia DOQ-CGCRE-008 – “Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos” (INMETRO/CGRE (2), 2003).

Quando se trata de processos de validação de métodos, estamos falando de padronizações confiáveis utilizadas em diferentes laboratórios no país e no mundo. Para tanto existe a necessidade da padronização de uma linguagem com o objetivo único de que todos os laboratórios obtenham as mesmas conclusões através da utilização de um método.

Uma terminologia internacionalmente clara e as interpretações de definições representam um papel essencial dentro da comunidade científica em todo o mundo (MAJEEN, 2003).

Internacionalmente, tem sido utilizado como guia a “International Vocabulary of General Terms in Metrology” (VIM), porém MAJEEN (2003) chama a atenção da existência de ambigüidades em alguns termos e a necessidade de harmonizar a linguagem através de termos consistentes. O Brasil utiliza a mesma guia, tendo sido estabelecida através da Portaria INMETRO nº 029, de 10 de março de 1995 (BRASIL, 1995).

3.5. Protocolos de validação de métodos de análise microbiológica

3.5.1. Protocolo de validação AOAC

Vários órgãos internacionais têm protocolos de validação de métodos de análise microbiológica de alimentos, sendo mais amplamente aceitos os da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), que dispõe de três programas: OMA (Official Methods of Analysis), PVM (Peer-Verified Methods) e PTM (Performance Tested Methods) (ANDREWS, 1996, ANDREWS, 1997, SMEDT, 1998). O programa de validação da AOAC está baseado na avaliação interlaboratorial entre um mínimo de oito laboratórios, embora um menor número de participantes possa ser aceito no programa PVM, participação de dois ou três laboratórios no processo (LAUWAARS, 1998).

Os dados necessários para o programa de validação exigido pelos três métodos estão relacionados no quadro 12 (LAUWAARS, 1998).

Quadro 12: Dados necessários aos programas de validação da AOAC:

AOAC/OMA	AOAC/PTM	AOAC/PVM
1. Especificidade;	1. Especificidade;	1. Especificidade;
2. Sensibilidade;	2. Sensibilidade;	2. Sensibilidade;
3. Taxa de falsos positivos;	3. Taxa de falsos positivos;	3. Taxa de falsos positivos;
4. Taxa de falsos negativos;	4. Taxa de falsos negativos;	4. Taxa de falsos negativos;
5. Limite de detecção;	5. Limite de detecção;	5. Limite de detecção;
6. Precisão;	6. Precisão;	6. Precisão;
7. Acurácia;	7. Acurácia;	7. Acurácia;
8. Matriz;	8. Matriz;	8. Matriz;
9. Robustez;	9. Robustez;	9. Robustez;
10. Recuperação;	10. Recuperação;	10. Recuperação;
11. Repetibilidade;	11. Repetibilidade;	11. Repetibilidade;
12. Estudo colaborativo;	12. Reprodutibilidade;	12. Comparação com método de referência;
13. Comparação com método de referência;	13. Comparação com método de referência;	
14. Certificação de qualidade.	14. Certificação de qualidade.	

3.5.1.1. Official Methods of Analysis (OMA)

Esse programa, cujo protocolo é harmonizado com a norma de validação de métodos alternativos da International Standards Organization (ISO 16140, 1999) (FELDSINE et al., 2002), é o mais completo e rigoroso da AOAC, objetivando a validação dos métodos que são adotados como oficiais pela associação, passando a integrar seu manual de métodos (AOAC Official Methods of Analysis). A avaliação segue basicamente cinco etapas, que são teste de robustez, estudo pré-colaborativo, estudo colaborativo, primeira ação de oficialização e oficialização final (ANDREWS, 1996).

3.5.1.1.1. Teste de robustez (Ruggedness testing).

Antes do início do processo de validação, o método é submetido a uma avaliação do desempenho, quando pequenas alterações são introduzidas no procedimento, no ambiente ou ambos. O teste é conduzido por um único laboratório, mas, mesmo assim, é possível determinar a influência de fatores como a mudança do analista, do operador dos instrumentos, do fornecedor de meios e reagentes, da temperatura ou tempo de incubação, dentre outras.

3.5.1.1.2. Estudo pré-colaborativo.

O estudo pré-colaborativo tem duas funções, antecipar e resolver problemas e dificuldades que possam ocorrer durante o estudo colaborativo posterior e determinar o escopo do método, ou seja, se é aplicável a um único tipo de alimento, a um grupo de alimentos semelhantes (ostras e mexilhões, por exemplo), a uma categoria mais ampla de produtos (alimentos da baixa umidade, por exemplo) ou a todos os alimentos. Quando o escopo é a análise de alimentos em geral, o estudo é conduzido com pelo menos vinte tipos de produtos diferentes.

3.5.1.1.3. Estudo colaborativo.

O estudo colaborativo envolve pelo menos oito laboratórios independentes, na validação de métodos quantitativos, e quinze na validação de métodos qualitativos. O número mínimo de tipos de produtos para o escopo de alimentos em geral é cinco, inoculados ou naturalmente contaminados com o microrganismo alvo, em dois níveis de contaminação. O número mínimo de amostras de cada produto/nível de contaminação é cinco e o número de replicatas/amostra/nível de contaminação é dois para métodos quantitativos e cinco para métodos qualitativos. Sempre que possível, devem ser usadas amostras naturalmente

contaminadas, só sendo feita a opção pelas amostras artificialmente inoculadas quando se esgotarem as chances de obtenção de amostras contaminadas naturalmente. Nessa situação, é importante avaliar criteriosamente a escolha das cepas a serem inoculadas, como por exemplo, quais e quantos dos mais de 2.200 sorótipos de *Salmonella* existentes ou quais e quantos gêneros de coliformes, dentre os que compõem o grupo coliforme total. Também é importante avaliar a inclusão ou não de competidores, para uma melhor simulação das condições que seriam encontradas naturalmente. Uma vez feitas as opções, todos os laboratórios participantes recebem um conjunto das mesmas amostras, que serão analisadas e os resultados enviados ao diretor do estudo, para análise estatística e conclusão.

3.5.1.1.4. Primeira ação de oficialização.

Se o estudo colaborativo for bem sucedido é feita a recomendação para a primeira ação de oficialização. A recomendação é julgada em várias instâncias e a decisão final é do Comitê de Métodos Oficiais da AOAC, devendo ser aprovada por 2/3 dos membros. Uma vez aprovado, o método será incorporado à próxima edição do manual AOAC Official Methods of Analysis. No caso dos métodos cujo escopo é a análise de alimentos em geral, a AOAC reconhece as limitações do processo de validação – se um método se mostrou eficaz na análise dos produtos incluídos no estudo pré-colaborativo e colaborativo, isso garante que será eficaz com todos os alimentos? A resposta a essa questão não é fácil e, em função disso, o Comitê de Métodos Oficiais estabelece que a decisão não deva considerar apenas os resultados dos estudos pré-colaborativo e colaborativo, mas também estudos feitos fora da Associação e dados da literatura, que corroborem a conclusão (AOAC INTERNATIONAL, 1993). O mesmo documento enfatiza ainda que, independente do escopo dos métodos oficializados pela AOAC, sua utilização por qualquer laboratório deve ser precedida de uma avaliação, para verificar se são adequados aos produtos que serão analisados.

3.5.1.1.5. Oficialização final.

Entre a primeira ação de oficialização e a oficialização final há um intervalo de pelo menos 2 anos, para que todas as partes interessadas tenham oportunidade de se manifestar. Esse período é importante para que novos estudos sejam relatados e novas evidências venham a corroborar ou não os resultados anteriores. Em caso positivo, o Comitê de Métodos Oficiais julga a recomendação de oficialização final que, se aprovada, é anunciada no periódico "The Referee" da AOAC. No mesmo volume é colocado um encarte para votação e todos os membros da AOAC podem participar da decisão. O método será oficializado se 2/3 da maioria dos membros for favorável à aprovação.

3.5.1.2. Peer-Verified Methods (PVM)

Esse programa é direcionado a laboratórios que necessitam de um processo de validação mais simples e mais rápido do que o programa OMA. Os procedimentos mais adequados a esse programa são novos métodos, geralmente para atender necessidades específicas, revisão de métodos existentes, geralmente para ampliar o escopo de aplicação ou melhorar o desempenho e adaptação de métodos, geralmente para automação das análises. É direcionado a métodos não comerciais.

O estudo é conduzido com pelo menos seis amostras em três concentrações por matriz, e ao menos uma próxima ao nível de especificação normal. O laboratório interessado e pelo menos mais um independente precisam participar do processo (LAUWAARS, 1998).

Caso o método seja aprovado, é dado o status de PVM, publicado como um método individual, publicação do estudo em uma revista da AOAC, com validade de cinco anos. O método aprovado como PVM pode ser modificado de acordo com a necessidade dos usuários e essas modificações, com suporte dos dados são enviadas a AOAC e publicada como uma nota atrelada ao método original.

As etapas de validação são:

- 1) Geração de dados pelo laboratório proponente;
- 2) Descrição do procedimento em um formato apropriado;
- 3) Delineamento de um protocolo de validação;
- 4) Seleção de um laboratório independente para conduzir os testes;
- 5) Realização dos testes pelo laboratório independente;
- 6) Avaliação dos resultados pelo laboratório proponente e envio dos dados à AOAC;
- 7) Avaliação dos dados pela AOAC e, se aprovados, certificação do procedimento como “Método Verificado pelos Pares” (Peer-Verified Method).

3.5.1.3. Performance Tested Methods (PTM)

Esse programa é direcionado à validação de “kits” diagnósticos com marca registrada, definidos pela AOAC como um sistema contendo todos os componentes chaves para a realização da análise de um ou mais microrganismos em um ou mais tipos de alimentos, segundo um determinado método” (ANDREWS, 1997). Todo o processo é conduzido pela AOAC Research Institute, uma subsidiária da AOAC International, estabelecida em 1992 para atender à necessidade de um protocolo de validação mais rápido do que o programa OMA. O processo consiste na realização de um estudo idêntico ao pré-colaborativo e, em caso de sucesso, emissão de um certificado de “Método de Desempenho Testado” (Performance Tested Method), que tem validade de 1 ano.

Os dados avaliados geralmente incluem: robustez, curva de calibração, acurácia, precisão, reações cruzadas, estabilidade dos componentes do “kit”, limite de detecção, limite de quantificação, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos (LAUWAARS, 1998).

Os passos para a validação incluem:

- 1) Elaboração das informações necessárias pelo fabricante e submissão à avaliação;
- 2) Descrição do procedimento em um formato apropriado;
- 3) Delineamento de um protocolo de validação;
- 4) Designação dos revisores e laboratórios de análises independentes para as avaliações;
- 5) Realização das análises independentes;
- 6) Avaliação dos resultados pelos revisores;
- 7) Inserção de revisões;
- 8) Avaliação dos dados pela AOAC e, se aprovados, certificação do Kit como PTM;
- 9) Licença de uso válida por 1 ano.

Alterações nos kits validados devem ser reavaliadas com o mesmo nível exigido para a certificação.

3.5.2. Indicadores de desempenho utilizados nos programas de validação da AOAC

Os três programas da AOAC têm protocolos de validação harmonizados e os programas PVM e PTM equivalem ao estudo pré-colaborativo do programa OMA (AOAC, 1999). Os indicadores de desempenho utilizados nos três casos, para métodos qualitativos de análise microbiológica, são: precisão relativa, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, sensibilidade, especificidade, inclusividade e exclusividade (ANDREWS, 1996, McCLURE, 1990).

3.5.2.1. Precisão relativa

Precisão relativa é a fração de amostras positivas que foram corretamente identificadas pelo método em teste, isto é $[\text{n}^\circ \text{ de amostras positivas pelo método teste} / \text{n}^\circ \text{ de amostras positivas pelo método de referência}]$.

3.5.2.2. Taxa de falsos positivos (pf+).

Taxa de falsos positivos é a probabilidade de uma amostra negativa pelo método de referência ser detectada como positiva pelo método teste, isto é, $[\text{n}^\circ \text{ de amostras positivas pelo método teste e negativas pelo método de referência} / \text{n}^\circ \text{ total de amostras negativas pelo método de referência}]$.

3.5.2.3. Taxa de falsos negativos (pf-).

Taxa de falsos negativos é a probabilidade de uma amostra positiva pelo método de referência ser detectada como negativa pelo método teste, isto é, $[\text{n}^\circ \text{ de amostras negativas pelo método teste e positivas pelo método de referência} / \text{n}^\circ \text{ total de amostras positivas pelo método de referência}]$.

3.5.2.4. Sensibilidade (p+).

Sensibilidade é a probabilidade de uma amostra positiva pelo método de referência ser corretamente detectada como positiva pelo método teste, isto é, $[100 - \text{taxa de falsos negativos}]$.

3.5.2.5. Especificidade (p-).

Especificidade é a probabilidade de uma amostra negativa pelo método de referência ser corretamente detectada como negativa pelo método teste, isto é, $[100 - \text{taxa de falsos positivos}]$.

3.5.2.6. Inclusividade.

Inclusividade é o parâmetro que mede a capacidade do método em detectar o maior número possível de cepas do microrganismo ou grupo de microrganismos alvo do teste. Na análise de *Salmonella*, por exemplo, seria a capacidade de detectar os mais de 2.200 sorótipos existentes, sendo necessário demonstrar a reatividade com aproximadamente 200 sorótipos para ser considerado aceitável pela AOAC.

3.5.2.7. Exclusividade.

Exclusividade é o parâmetro que mede a capacidade do método em não detectar o maior número possível de microrganismos taxonomicamente relacionados ou que compõem a microbiota acompanhante do microrganismo alvo. Na análise de *Salmonella*, por exemplo, seria a não reatividade com enterobactérias, demonstrada com pelo menos 10 a 12 espécies da família *Enterobacteriaceae*.

3.5.3. Protocolo de validação ISO 16.140

Outro processo de validação de métodos alternativos foi elaborado pela ISO em conjunto com o European Committee for Standardization (CEN), a ISO 16.140, que ainda não está em vigor no Brasil.

A ISO 16.140 define os princípios gerais e protocolos técnicos para a validação de métodos alternativos no campo de análises microbiológicas de alimentos, ração animal e amostras ambientais e veterinária.

Este protocolo de validação aparenta ser mais completo, incluindo as análises estatísticas necessárias, porém ainda encontrava-se em fase de implantação por ocasião do início das análises deste trabalho. Em 2003, após a

aprovação final pela ISO foi colocada a disposição a versão final deste protocolo (ISO 16.140, 2003).

Como no processo de validação pela AOAC, o protocolo de validação da ISO 16.140 também contempla a validação de métodos qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos têm sua resposta baseada na presença/ausência do microrganismo alvo por detecção direta ou indireta no alimento. Os métodos quantitativos estão baseados na quantidade do microrganismo alvo determinados direta ou indiretamente. As avaliações estatísticas dos métodos qualitativos baseiam-se principalmente no teste de McNemar para resultados discordantes. Para os métodos quantitativos as avaliações estatísticas são baseadas na linearidade, precisão relativa, e na tendenciosidade dos dados obtidos pelos dois métodos, envolvendo cálculos mais complexos, através de regressão linear (ISO16.140, 2003). Neste ponto temos uma vantagem do protocolo de validação pela ISO 16.140 em relação ao protocolo da AOAC, já que os cálculos são melhor detalhados. Neste estudo de validação do BAX® System, o método está baseado simplesmente na presença/ausência do patógeno sendo, portanto, utilizado o protocolo de validação para métodos qualitativos.

O protocolo de validação da ISO 16.140 compreende duas fases: a primeira compreende um estudo comparativo do método alternativo com o método de referência e segunda, um estudo interlaboratorial dos dois métodos.

3.5.3.1. Estudo comparativo entre os métodos.

O estudo é realizado por um laboratório independente com os mesmos objetivos para o estudo pré-colaborativo da AOAC descrito no item 3.5.1.1.2.

3.5.3.2. Estudo interlaboratorial.

O estudo interlaboratorial envolve 10 laboratórios independentes para a validação de métodos qualitativos e quinze na validação de métodos quantitativos. Para a validação do método para todos os tipos de alimentos são necessárias análises de 5 categorias diferentes de alimentos, sendo 60 amostras para cada categoria, ou análises de 20 porções diferentes de cada tipo de alimento representativo da categoria produzindo pelo menos um total de 60 resultados para cada categoria por método. É desejável que se produzam pelo menos 50% de resultados positivos e 50% negativos com preferência para amostras naturalmente contaminadas, só sendo feita a opção pelas amostras artificialmente inoculadas quando se esgotarem as chances de obtenção de amostras contaminadas naturalmente (ISO 16.140, 2003).

3.5.4. Indicadores de desempenho utilizados nos programas de validação da ISO 16.140

3.5.4.1. Precisão relativa.

Corresponde ao grau de correlação entre as respostas obtidas pelo método de referência e pelo método alternativo de amostras idênticas. Observar aqui que a correlação entre os dois métodos não implica necessariamente que o método de referência adotado forneça o resultado aceitável oficialmente.

3.5.4.2. Desvio positivo ou taxa de falsos positivos.

Idem ao descrito no item 3.5.2.2.

3.5.4.3. Desvio negativo ou taxa de falsos negativos.

Idem ao descrito no item 3.5.2.3.

3.5.4.4. Sensibilidade relativa.

Habilidade do método alternativo em detectar o microrganismo alvo quando detectado pelo método de referência.

3.5.4.5. Especificidade relativa.

Habilidade do método alternativo de não detectar o microrganismo alvo quando ele não é detectado pelo método de referência.

3.5.4.6. Nível de detecção relativa.

É o menor número de microrganismos que podem ser detectados na amostra em 50% das ocasiões pelos dois métodos.

3.5.4.7. Inclusividade e Exclusividade.

Para a avaliação de inclusividade são analisadas 50 culturas puras do microrganismo alvo (30 cepas puras no caso de *Salmonella*).

Para a avaliação da exclusividade do método são analisadas 30 culturas puras de microrganismos que podem interferir com o microrganismo alvo.

Em ambos os casos são avaliadas diluições da cultura pura sem a presença do alimento.

3.6. Resultados de comparações e validações do Sistema Bax® realizados no Brasil e no exterior.

3.6.1. Resultados da validação do BAX® pela AOAC

O sistema BAX® de análise de *Salmonella* em alimentos foi validado pelo programa PTM da AOAC, através da análise de 775 amostras de 20 tipos de alimentos, com os seguintes resultados (AOAC RI, 2002): Precisão relativa = 99,4%, Taxa de falsos positivos (pf+) = 1,6%, Taxa de falsos negativos (pf-) = 1,3%, Sensibilidade (p+) = 98,7%, Especificidade (p-) = 98,3%, Inclusividade = 100% (194 cepas de *Salmonella*), Exclusividade = 100% (35 cepas não *Salmonella*).

Em 2003 o sistema BAX® foi oficializado pela AOAC e designado como AOAC Official Methods número 2003.09.

3.6.2. Resultados de trabalhos colaborativos de validação do BAX® System

Vários trabalhos foram publicados no processo de validação deste novo sistema como PTM pela AOAC, demonstrando resultados acima de 95% de correlação com o sistema tradicional BAM/FDA (BAILEY, 1998; BENNETT et al., 1998). Os resultados destas avaliações têm se mostrado favorável à adoção deste método como oficial em vários países.

O trabalho de MROZINSKI et al. (1998) apresentou como resultados de desempenho: sensibilidade = 98%; especificidade = 97%; taxa de falsos negativos <2%; taxa de falsos positivos <3% e precisão relativa = 98%.

Na França foi realizado um trabalho por DIESEL et al. em 1999 comparando o sistema Bax® e o método BAM/FDA, que apresentou um nível de correlação de 99,4% e um limite de detecção entre 10^3 - 10^4 UFC/ml.

Até 2000 o sistema BAX não era automatizado, consistindo apenas dos tabletes em tubos Eppendorf contendo os primers, ácidos nucleicos e enzima e a análise era conduzida por eletroforese em gel, o que, no entanto, já representou uma grande revolução no processo de análise por PCR. A partir da automação do sistema eliminou-se a utilização da eletroforese em gel, e os resultados passaram a ser apresentados direto pelo software como presença/ausência, garantindo então uma qualidade maior às análises.

Um estudo conduzido por STEWART et al. (2002) comparou três diferentes métodos de detecção de *Salmonella* em broto de alfafa e água de irrigação utilizada, o BAX System, o Gold *Salmonella* EIA e o GENE-TRACK *Salmonella* DLP, utilizando como método de referência o método cultural BAM/FDA. Os três métodos estão detalhados no capítulo 2. Dos três métodos de detecção o BAX System apresentou o menor limite de detecção, ou seja, pelo menos 10^2 UFC podem ser detectadas por este método, contra 10^5 e 10^6 UFC para GENE-TRACK e Gold EIA respectivamente, porém surpreendentemente foi o que apresentou menor número de amostras detectadas como positivas em amostras artificialmente contaminadas com 4 diferentes sorotipos de *Salmonella* em nível baixo de contaminação. Os autores apresentam como explicação dois fatores: o primeiro seria o protocolo de enriquecimento, que utiliza meio não seletivo, enquanto os demais métodos, inclusive o de referência, utilizam mais etapas de enriquecimento, com meios seletivos e as amostras utilizadas apresentam um alto nível de microrganismos competidores, e segundo, a presença de inibidores de PCR presentes nas amostras, que poderiam limitar a eficiência da amplificação do DNA alvo.

SILBERNAGEL et al. em 2003 conduziram um estudo interlaboratorial (16 laboratórios ao todo), com o método já automatizado, avaliando 5 tipos de alimentos contaminados artificialmente em três níveis de contaminação (alto: 0,93 ~ 0,11 UFC/g, baixo: 0,03 ~ 0,04 UFC/g e controle: < 0,03 UFC/g) e um contaminado naturalmente, com um total de 1386 amostras. Apresentando o seguinte resultado: Sensibilidade (p+) = 93,8% e 99% para baixo e alto nível de

contaminação, respectivamente, contra 83% e 92,2% do método de referência (BAM/FDA) para baixo e alto nível de contaminação, respectivamente. Para os demais parâmetros os resultados foram extremamente satisfatórios, possibilitando a adoção do método como oficial pela AOAC.

Os estudos demonstram que o sistema BAX para análise de *Salmonella* é um sistema confiável tanto no rastreamento de patógenos, como amplia e facilita pesquisas como a realizada por OSCAR (2003) trabalhando com microbiologia preditiva e modelo de risco para patógenos de origem alimentar.

3.6.3. Comentários finais sobre a validação do BAX no Brasil

Os estudos de avaliação realizados até o momento são extremamente promissores, porém, poucos estudos foram realizados no Brasil, na análise de produtos brasileiros. A prevalência dos diferentes sorótipos de *Salmonella* varia entre os países e, no estudo do BAX, a AOAC avaliou 194 (AOAC RI, 2002), quando há mais de 2.200 conhecidos. A variedade de microrganismos que compõem a microbiota acompanhante nos produtos também apresenta características regionais e, no estudo da AOAC, foram avaliadas 35 cepas, cuja identidade não foi relatada e podem não ser relevantes para os produtos locais. Além disso, foram utilizados no estudo 20 tipos de alimentos, incluindo-se produtos que não pertencem à realidade do país e excluindo-se outros que são importantes nas exportações brasileiras ou no mercado interno (frangos congelados, vegetais folhosos consumidos crus, açúcar, café, farinhas). Assim, conforme enfatizado pela própria AOAC, é importante que o método seja avaliado localmente, além de ser uma exigência para credenciamento de ensaios segundo a norma ISO 17025.

Durante a execução deste trabalho, paralelamente mais quatro laboratórios realizaram análises para o processo de validação deste sistema, conduzido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): LARA-SP, LARA-PE, SFDK-SP e FOOD INTELLIGENCE-SP. Juntos os quatro laboratórios conduziram a análise de 1879 amostras de 70 tipos diferentes de alimentos, culminando com a oficialização do método A-BAX para análise de *Salmonella* no Brasil, publicado no Diário Oficial da União em 15 de junho de 2004, seção1, como Instrução Normativa nº 41 de 7 de junho de 2004 (Anexo24).

CAPÍTULO 4:

Validação do Sistema BAX[®] na detecção de *Salmonella* sp em alimentos consumidos no Brasil

4. Validação do Sistema BAX na detecção de *Salmonella* sp em alimentos consumidos no Brasil

4.1. Material e método

4.1.1. Amostragem

Na realização do estudo foram analisadas 741 amostras de alimentos, obtidas de indústrias alimentícias, produtores, restaurantes populares ou barcos pesqueiros do Estado de São Paulo, durante o período de agosto de 2003 a dezembro de 2004. As amostras foram coletadas aleatoriamente, de forma asséptica, e colocadas em recipientes estéreis, ou obtidas com a embalagem própria. Os tipos de amostras analisadas encontram-se descritas na tabela 1.

4.1.2. Método de referência

Foi utilizado como método de referência na realização do estudo a metodologia de análise de *Salmonella* da Food and Drug Administration (FDA), descrita no Bacteriological Analytical Manual 8^o Edição, Revisão A (FDA, 1998) e no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods da American Public Health Association (APHA), 4^o Edição (DOWNES & ITO, 2001), conforme descrito na figura 11.

4.1.3. Método de análise pelo sistema BAX®

Foi utilizada a metodologia descrita pelo fabricante, conforme apresentado na figura 12. O equipamento e acessórios de PCR requeridos nas análises foram cedidos pela Dupont/Qualicon, durante o período de duração do trabalho. Os Kits de análise de *Salmonella* foram adquiridos do representante oficial da Dupont/Qualicon no Brasil.

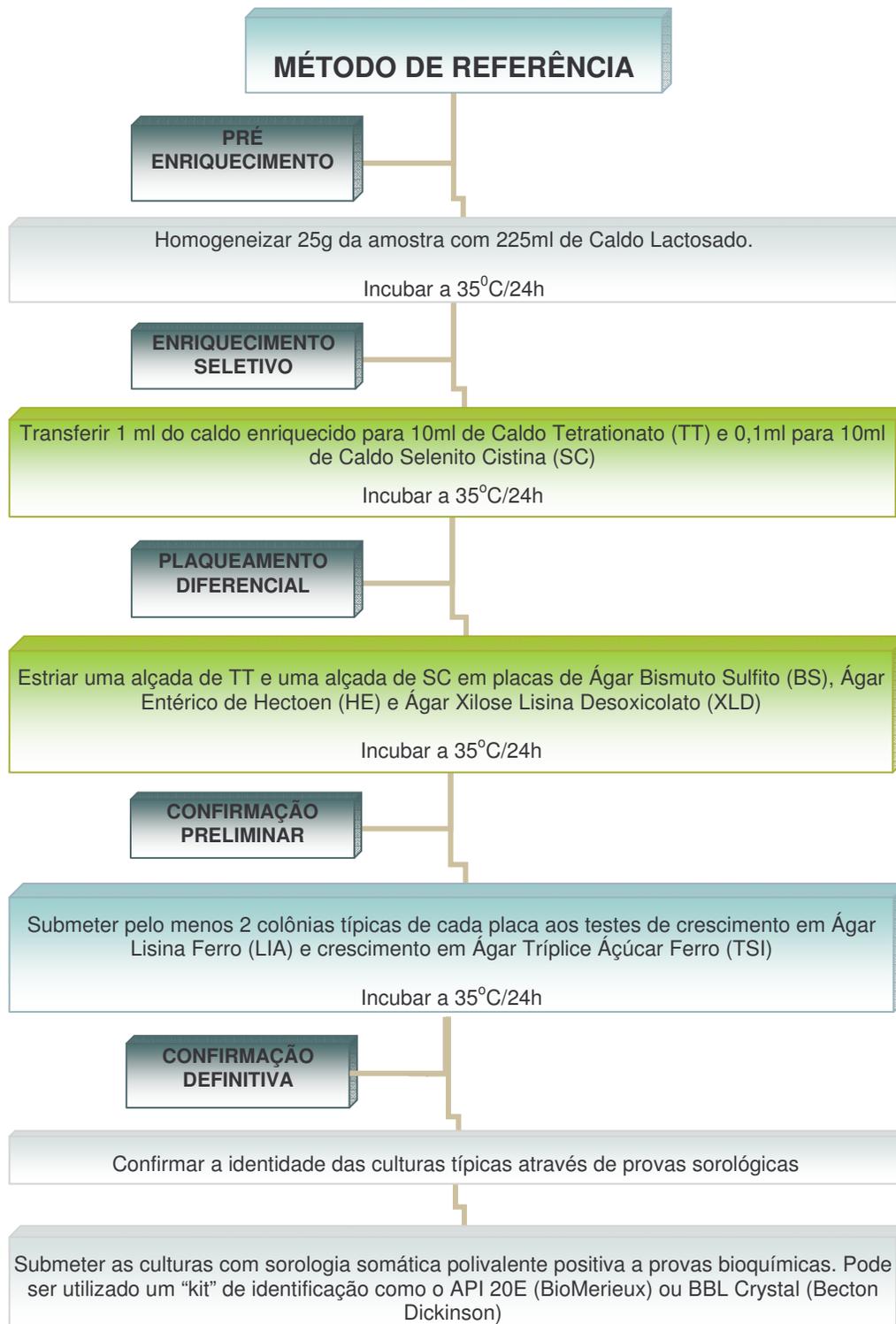


Figura 11: Método de referência utilizado na análise de *Salmonella* (método tradicional, FDA, 1998).

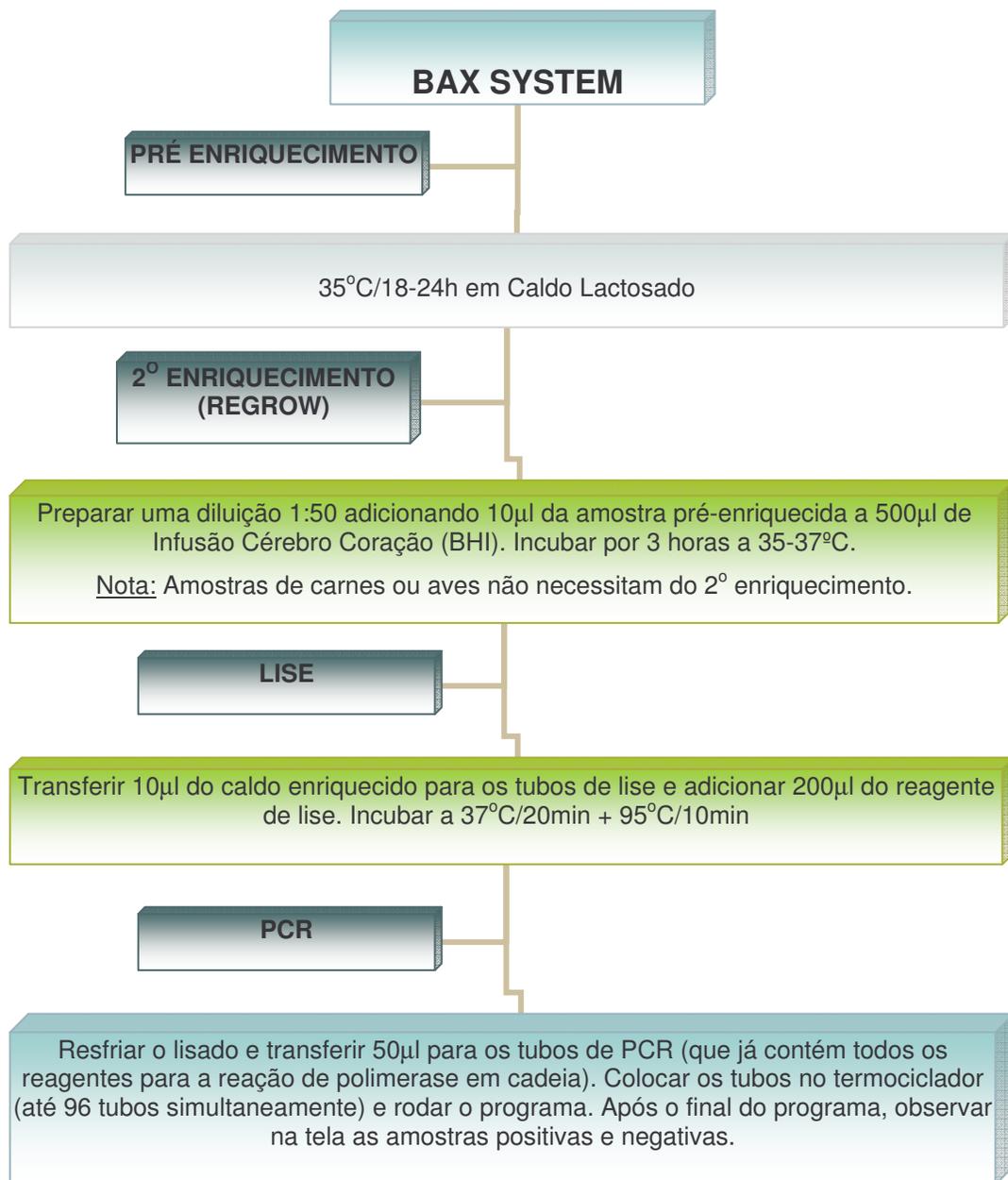


Figura 12: Método de análise de *Salmonella* utilizando o sistema BAX®.

Tabela 1: Grupos de alimentos e número de amostras analisadas na realização do estudo de validação do sistema Bax®.

Grupo	Tipo de produto	Nº amostras
1	Frutas, produtos de frutas e similares	25
2	Hortaliças, legumes, raízes e tubérculos	32
3	Cogumelos	27
4	Sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas	39
5	Especiarias, temperos, condimentos e molhos preparados	18
6	Açúcar, adoçantes e similares	12
7	Produtos a serem consumidos após adição de líquido com calor	28
8	Produtos sólidos prontos para consumo (petiscos e similares)	32
9	Chocolates, balas, goma de mascar e produtos de confeitaria	12
10	Pratos prontos para consumo (cozinhas e restaurantes)	36
11	Alimentos infantis	30
12	Carnes e produtos cárneos	24
13	Pescados e produtos de pesca	28
14	Ovos e derivados	71
15	Leite	18
16	Queijos	40
17	Outros produtos de laticínio	22
18	Bolos, biscoitos, pães e similares	61
19	Amido, fubá, farinhas e massas	28
20	Grãos, sementes e farelos	38
21	Ração animal e ingredientes para formulação de ração animal	43
22	Diversos	44
23	Alimentos inoculados artificialmente	33
Total		741

4.1.4. Inoculação artificial das amostras

Cada amostra foi inoculada com uma cultura pura de *Salmonella* (*S. Cholerasuis* IAL 364, *S. Typhimurium* FIOCRUZ ou *S. Mbandaka* FIOCRUZ), adicionadas em 3 níveis de inóculo: alto (500 UFC/25g), médio (50 UFC/25g) e baixo (5 UFC/25g). A quantificação do inóculo foi realizada através de contagem em placas pelo método de superfície. O procedimento utilizado na inoculação e análise dessas amostras encontra-se detalhado na figura 13.

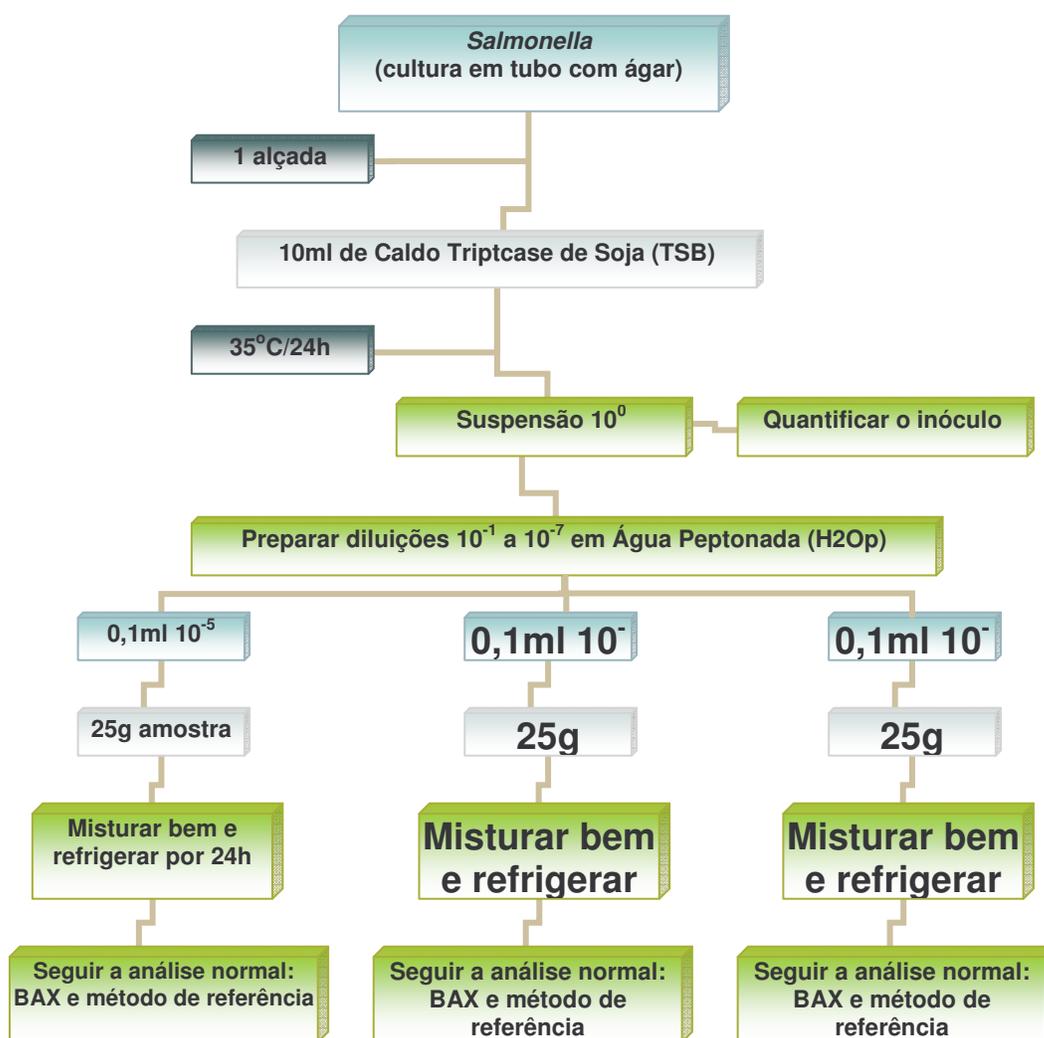


Figura 13: Esquema de inoculação e análise de amostras artificialmente contaminadas.

4.1.5. Indicadores de desempenho

Ao final do estudo, para cada tipo de alimento, em cada nível de inóculo (quando aplicado), foi preenchido o quadro abaixo, com os resultados obtidos. A partir dos dados inseridos no quadro, foram calculados os parâmetros de desempenho e o valor do chi quadrado, utilizando as fórmulas 4.1.5.1. a 4.1.5.5 (FELDSINE et al., 2002).

Quadro 13: Quadro utilizado para o cálculo dos indicadores de desempenho:

Resultado do método de referência	Resultado do método alternativo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	$N_{11} (+ +)$	$N_{12} (+ -)$	$N_{1\bullet}$
Negativo	$N_{21} (- +)$	$N_{22} (- -)$	$N_{2\bullet}$
Total	$N_{\bullet 1}$	$N_{\bullet 2}$	$N = N_{1\bullet} + N_{2\bullet}$ ou $N_{\bullet 1} + N_{\bullet 2}$

N = Número de resultados em uma célula em particular, onde o primeiro número subscrito é a linha e o segundo número subscrito é a coluna.

N_{11} = Linha 1, coluna 1 = Número amostras positivas pelo método de referência e pelo método alternativo.

N_{12} = Linha 1 coluna 2 = Número amostras positivas pelo método de referência e negativas pelo método alternativo.

N_{21} = Linha 2 coluna 1 = Número amostras negativas pelo método de referência e positivas pelo método alternativo.

N_{22} = Linha 2 coluna 2 = Número amostras negativas pelo método de referência e pelo método alternativo.

$N_{1\bullet}$ = Linha 1 total = Total de amostras positivas pelo método de referência.

$N_{2\bullet}$ = Linha 2 total = Total de amostras negativas pelo método de referência.

$N_{\bullet 1}$ = Coluna 1 total = Total de amostras positivas pelo método alternativo.

$N_{\bullet 2}$ = Coluna 2 total = Total de amostras negativas pelo método alternativo.

4.1.5.1. Sensibilidade

$$(p+) = N_{11} / N_{1\bullet}$$

4.1.5.2. Especificidade

$$(p-) = N_{22} / N_{2\bullet}$$

4.1.5.3. Taxa de falsos negativos

$$(pf-) = N_{12} / N_{1\bullet}$$

4.1.5.4. Taxa de falsos positivos

$$(pf+) = N_{21} / N_{2\bullet}$$

4.1.5.5. Chi Quadrado

$$(\chi^2) = [(|N_{12} - N_{21}|) - 1]^2 / (N_{12} + N_{21}), \text{ graus de liberdade} = 1$$

4.1.6. Teste de Inclusividade

Para a avaliação da inclusividade foram analisadas culturas puras das seguintes cepas de *Salmonella*, cedidas pelas coleções de culturas do LARA Campinas (Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura), IAL (Instituto Adolfo Lutz de São Paulo) e ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas), conforme a tabela 2.

Tabela 2: Culturas puras de cepas de *Salmonella* utilizadas no teste de inclusividade:

CEPA	Identificação	Coleção de cultura
<i>Salmonella</i> Bredeney	007 RM	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Mbandaka	0839 TR	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Senftenberg	0866 TMX	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Indiana	0683 RX	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Indiana	0977 RM	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0706 SCX	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0708 RM	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0808 RX	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	IAL São Paulo
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0864 SCM	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0866 SCM 1	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0868 SCX	LARA Campinas
<i>Salmonella</i> Enteritidis		ITAL
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	IAL 2364	IAL São Paulo
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	ATCC 15442	ITAL
<i>Salmonella</i> Dublin		ITAL

4.1.7. Verificação do limite de detecção do sistema BAX®

Para determinar o valor mínimo de células de *Salmonella* que o PCR do Sistema Bax é capaz de detectar, em cultura pura, suspensões de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, com concentrações decrescentes, foram submetidas ao processo de lise e amplificação. Para esclarecer a dúvida quanto à detecção ou não de células mortas, alíquotas dessas suspensões foram fervidas e também submetidas ao processo de lise e amplificação. O procedimento utilizado para esses testes encontra-se descrito na Figura 14.

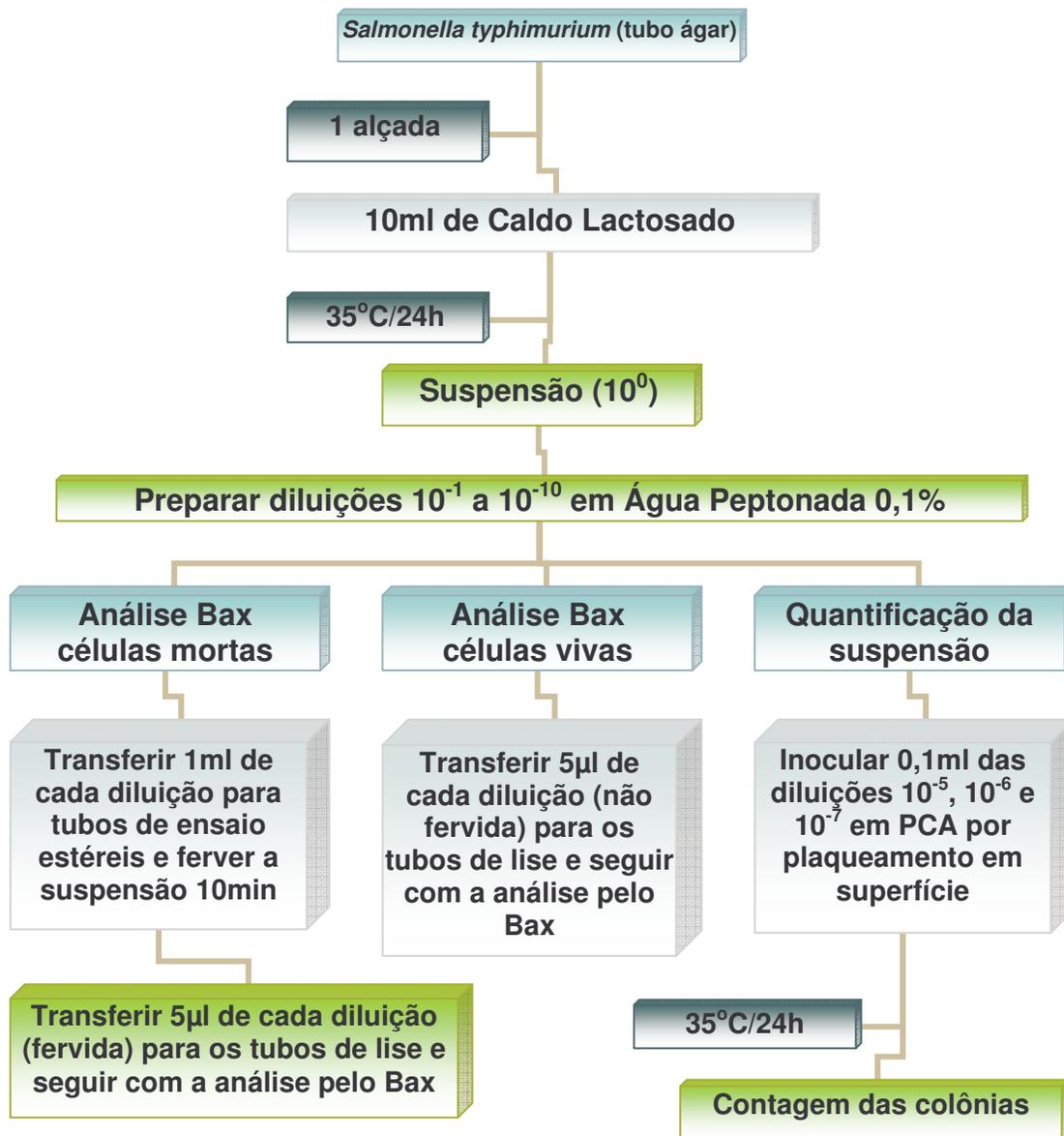


Figura 14: Esquema de análise para determinar o limite de detecção do PCR do Sistema Bax® e a capacidade de detectar células mortas.

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Resultados das análises

Os resultados obtidos nas análises das 741 amostras encontram-se sumariados nos Anexos 1 a 23. A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, por grupo de alimentos, encontra-se na Tabela 3.

Os dados mostraram que, no universo de produtos analisados no trabalho, a incidência de *Salmonella* foi baixa. Excluindo-se as 33 amostras contaminadas artificialmente, das 708 restantes apenas 25 (3,5%) apresentaram contaminação por *Salmonella* (por pelo menos um dos métodos). A maioria dos grupos não apresentou amostras contaminadas, encontradas mais freqüentemente no grupo 20 (farelos) ($4/38 = 10,5\%$ das amostras) e no grupo 21 (rações animais) ($11/43 = 25,5\%$ das amostras).

4.2.2. Parâmetros de desempenho

Os resultados do cálculo dos parâmetros de desempenho encontram-se na Tabela 4.

Em função da não ocorrência de amostras positivas em alguns grupos, o cálculo da sensibilidade e da taxa de falsos negativos foram prejudicados nesses grupos, porque envolvem divisão por zero. No entanto, para o total de amostras analisadas foi possível calcular todos os parâmetros de desempenho. Assim, sem considerar as amostras inoculadas artificialmente, obtivemos: sensibilidade 100%, especificidade 98,6%, taxa de falsos negativos 0 e taxa de falsos positivos 1,4%.

Tabela 3: Comparação dos resultados da análise de *Salmonella* pelo método de referência e pelo sistema BAX®.

Grupo	Nº amostras	Resultados Método Referência		Resultados Bax		Comparação Ref x Bax			
		+	-	+	-	++	+-	-+	--
1	25	0	25	0	25	0	0	0	25
2	32	0	32	0	32	0	0	0	32
3	27	0	27	0	27	0	0	0	27
4	39	0	39	0	39	0	0	0	39
5	18	0	18	0	18	0	0	0	18
6	12	0	12	0	12	0	0	0	12
7	28	0	28	0	28	0	0	0	28
8	32	0	32	1	31	0	0	1	31
9	12	0	12	0	12	0	0	0	12
10	36	0	36	0	36	0	0	0	36
11	30	0	30	0	30	0	0	0	30
12	24	1	23	1	23	1	0	0	23
13	28	0	28	1	27	0	0	1	27
14	71	0	71	1	70	0	0	1	70
15	18	0	18	0	18	0	0	0	18
16	40	0	40	1	39	0	0	1	39
17	22	0	22	0	22	0	0	0	22
18	61	0	61	0	61	0	0	0	61
19	28	0	28	2	26	0	0	2	26
20	38	3	35	4	34	3	0	1	34
21	43	11	32	11	32	11	0	0	32
22	44	0	44	3	41	0	0	3	41
Total não inoculadas	708	15	693	25	683	15	0	10	683
23 (inoculadas)	33	21	12	22	11	20	1	2	10
Total geral	741	36	705	47	694	35	1	12	693

Tabela 4: Parâmetros de desempenho do sistema BAX® de análise de *Salmonella*, em comparação com o método cultural da FDA.

Grupo	Nº amostras	Parâmetro de desempenho			
		Sensibilidade	Especificidade	Taxa falsos negativos	Taxa falsos positivos
1	25	/	100%	/	0
2	32	/	100%	/	0
3	27	/	100%	/	0
4	39	/	100%	/	0
5	18	/	100%	/	0
6	12	/	100%	/	0
7	28	/	100%	/	0
8	32	/	96,9%	/	3,1%
9	12	/	100%	/	0
10	36	/	100%	/	0
11	30	/	100%	/	0
12	24	100%	100%	0	0
13	28	/	96,4%	/	3,6%
14	71	/	98,6%	/	1,4%
15	18	/	100%	/	0
16	40	/	97,5%	/	2,5%
17	22	/	100%	/	0
18	61	/	100%	/	0
19	28	/	92,9%	/	7,1%
20	38	100%	97,1%	0	2,9%
21	43	100%	100%	0	0
22	44	/	93,2%	/	6,8%
Total não inoculado	708	100%	98,6%	0	1,4%
23 (inoculados)	33	95,2%	83,3%	4,8%	1,7%
Total geral	741	97,2%	98,3%	2,8%	1,7%

Na Tabela 5 apresentamos uma comparação dos resultados obtidos em nosso trabalho com os obtidos pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) (análise de 1879 amostras de 70 tipos de alimentos) (MAPA, 2004) e pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (análise de 775 amostras de 20 grupos de alimentos) (AOAC RI, 2002), bem como com as recomendações do FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United State Department of Agriculture) para kits de análise de *Salmonella* (USDA, 2002). Todos os parâmetros ficaram muito próximos aos da AOAC e do MAPA, e atenderam às recomendações do FSIS/USDA.

Tabela 5: Comparação dos parâmetros de desempenho do sistema BAX® para *Salmonella* obtidos em nosso trabalho com os obtidos pelo MAPA e AOAC e os valores recomendados pelo FSIS/USDA.

	Nossos resultados	Resultados do MAPA (2004)	Resultados da AOAC RI, 2002	Recomendações do FSIS/USDA (2002)
Sensibilidade	100%	98,1%	98,7%	≥ 97%
Especificidade	98,6%	98,5%	98,3%	≥ 90%
Taxa de falsos negativos	0	1,9%	1,3%	≤ 3%
Taxa de falsos positivos	1,4%	1,5%	1,6%	≤ 3%

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

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

4.2.3. Resultados discordantes

A análise dos resultados discordantes foi feita seguindo a orientação da ISO 16140 (2002). **a)** Dentro de cada grupo de alimentos, o número de resultados discordantes (falsos negativos + falsos positivos) não chegou a 6 em nenhum caso. Nessa situação, o teste de McNemar (Qui Quadrado) não se aplica, não havendo, na verdade, testes a serem aplicados.

b) Considerando o total de amostras analisadas, sem incluir as amostras contaminadas artificialmente (Grupo 23), o número de resultados discordantes foi 10 (zero falsos negativos + 10 falsos positivos). Para número de discordantes entre 6 e 22, a ISO 16140 também não recomenda a aplicação do teste de McNemar, mas sim o procedimento abaixo:

Definir o parâmetro **m** como sendo o número de falsos positivos ou o número de falsos negativos, escolhendo dentre eles o menor valor. Em nosso caso, como não há falsos negativos, o valor de **m** é o número de falsos positivos = 10.

Determinar o parâmetro **M** através da tabela 6:

Tabela 6: Determinação do parâmetro M para resultados discordantes

Número de resultados discordantes (falsos positivos + falsos negativos)	M
06 a 08	0
09 a 11	1
12 a 14	2
15 a 16	3
17 a 19	4
20 a 22	5

Se $m \leq M$ para um dado número de resultados discordantes, então os dois métodos são diferentes ($\alpha = 0,05$).

Em nosso caso $M = 1$, $m = 10$, $m > M$, logo, não houve diferença entre os métodos.

4.2.4. Limite de detecção do sistema BAX®

Os resultados da determinação do limite de detecção do PCR do Sistema Bax encontram-se na tabela 7. Trabalhando com células vivas, a presença de *Salmonella* foi detectada nas suspensões de cultura pura com contagem igual ou superior a $5,4 \times 10^2$ UFC/ml. Trabalhando com células mortas, a presença foi detectada nas suspensões com $5,4 \times 10^1$ UFC/ml ou superior.

Esses resultados deixaram claro alguns fatos: Em primeiro lugar, o PCR não distinguiu células vivas de células mortas, detectando as duas formas praticamente na mesma faixa de concentração. Em segundo lugar foi capaz de detectar *Salmonella* a partir de um número muito baixo de células vivas ou mortas, transferidas para a reação de lise (na transferência para os tubos de lise são transportados 10µl, ou seja, 100 vezes menos células do que a contagem presente na suspensão).

Tabela 7: Resultado da determinação do limite de detecção do Sistema Bax.

Contagem de <i>Salmonella</i> na suspensão (UFC/ml)	Resultado do PCR células vivas	Resultado do PCR células mortas
$5,4 \times 10^8$	+	+
$5,4 \times 10^7$	+	+
$5,4 \times 10^6$	+	+
$5,4 \times 10^5$	+	+
$5,4 \times 10^4$	+	+
$5,4 \times 10^3$	+	+
$5,4 \times 10^2$	+	+
$5,4 \times 10^1$	-	+
$5,4 \times 10^0$	-	-
$5,4 \times 10^{-1}$	-	-
$5,4 \times 10^{-2}$	-	-

4.2.5. Resultados do teste de inclusividade

Esse teste foi feito com um número relativamente pequeno de cepas de *Salmonella*, por limitações financeiras. Todas as cepas testadas foram detectadas pelo método.

4.3. Conclusões

Em nossa avaliação o sistema BAX é prático, facilitando e tornando mais rápida a realização das análises. Para os grupos de alimentos em que a taxa de falsos positivos ficou acima de 3%, é recomendável que as amostras positivas do BAX sejam confirmadas pelo método tradicional, até que se tenha uma quantidade maior de dados sobre a segurança dos resultados. A maior limitação para uma completa substituição do método tradicional pelo BAX é o preço dos kits, que pode ser restritivo. Fora da rotina, principalmente em ensaios com inoculação de células, é recomendável continuar com o método tradicional, até uma avaliação mais precisa do comportamento do método com relação às células mortas.

Vantagens e desvantagens do sistema Bax

O sistema BAX mostrou desempenho similar ao método tradicional, com grandes vantagens no prazo de análise (resultado definitivo em aproximadamente 30 horas). Outra grande vantagem foi a facilidade na realização do ensaio, com menos etapas de transferência e muito menos meios e reagentes a serem preparados.

É interessante notar que, embora os resultados tenham demonstrado que o PCR detecta células mortas, não houve diferença entre os dois métodos avaliados. A explicação para esse fato deve ser, provavelmente, a baixa presença de *Salmonella* nas amostras analisadas, abaixo do limite de detecção do BAX. Dessa forma, somente após o enriquecimento o número de células vivas atingiria

o limite de detecção. Por outro lado, nas situações em que o número de células mortas esteja acima do limite de detecção, o método provavelmente dará um falso resultado positivo. Esse é o caso, por exemplo, de testes desafio, nos quais se inocula um número alto de células e acompanha-se a sua destruição nos produtos, por métodos físicos ou químicos.

A comparação dos procedimentos deixa claro que a análise pelo BAX é muito mais simples e rápida do que pelo método tradicional ou qualquer outro método alternativo disponível atualmente.

Do ponto de vista do custo relativo das análises pelo método tradicional e pelo BAX pudemos verificar que, no cômputo geral, o método tradicional foi mais vantajoso. Cada análise pelo BAX® system custou aproximadamente R\$ 70,00 (US\$ 57.00)*, incluindo-se todos os meios, reagentes e descartáveis utilizados. No método tradicional, a estimativa para cada teste de presença/ausência foi de R\$ 10,00 (US\$ 8.00)* até a etapa de confirmação preliminar (sorologia somática, LIA, TSI e uréia) aplicada a 12 colônias suspeitas. Para a confirmação definitiva de cada colônia pré-selecionada, o “kit” de identificação bioquímica da BioMerieux (API 20E) custa R\$ 17,00 (US\$ 14.00)* no Brasil, podendo, portanto, chegar a R\$ 204,00 (US\$ 166.00)* se as 12 colônias atingirem essa etapa da análise. Assim, só em meios de cultura e reagentes, o custo da análise completa de *Salmonella* em uma amostra positiva pode chegar a R\$ 214,00 (US\$ 174.00)*, não sendo provável que custe menos do que R\$ 100,00 (US\$ 81.00)*, na hipótese de uma fração das colônias ser descartada na pré-seleção.

De fato, o que se verificou nesse ano de atividades foi que apenas 8% das amostras passaram para etapa de confirmação, 72% sendo eliminadas já no plaqueamento diferencial e mais 20% na confirmação preliminar. Assim, cada 100 análises pelo BAX custaram aproximadamente R\$ 7.000,00 (US\$ 5,700.00)*, enquanto pelo método tradicional ficaram em aproximadamente R\$ 2.500,00 (US\$ 2,033.00)*.

* Valores em dólares aproximados (cotação em 05/08/2005 - 1US\$ = R\$ 1,24)

Referências

Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ABEF, Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. **Receita com frango é a 2ª maior na lista das exportações.** Disponível em: <<http://www.abef.com.br/>>. Acesso em 18 mar. 2005.
2. ABIPECS, Associação Brasileira das Indústrias Produtoras e Exportadoras de Carne Suína. **Exportação Brasileira de carne suína.** Disponível em: <http://www.abipecs.com.br/foco_45.pdf> Acesso em 18 mar. 2005.
3. ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Salmonella – Determinação em alimentos. MB3465.** Rio de Janeiro, 1991.
4. ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR ISO 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro, 2001.
5. ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR ISO 19011: Diretrizes para auditoria de sistema de gestão da qualidade e/ou ambiental.** Rio de Janeiro, 2002.
6. ABNT/INMETRO. **ISO/IEC-GUIA 43-1: Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais, Parte 1, Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência.** Primeira edição, Rio de Janeiro, 1999.
7. AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-Like Receptor signaling. **Nature Reviews in Immunology**, London, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul., 2004.
8. ANDERSON, R. C.; ZIPRIN, R. L. Bacteriology of *Salmonella*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (Ed.) **Food Born Disease Handbook - Bacterial Pathogens**, 2nd edition. USA: Marcel Dekker, Inc., 2001. Vol. 1, p. 247-263.

9. ANDREWS, W.H. Validation of modern methods in food microbiology by AOAC International collaborative study. **Food Control**, Guildford v. 7, n. 1, p. 19-29, Feb., 1996.
10. ANDREWS, W.H. New trends in food microbiology: an AOAC International perspective. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v. 80, n. 4, p. 908-912, apr., 1997.
11. ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.& K. ITO (ed.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. Washington, D. C. American Public Health Association, 2001, Cap. 37.
12. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 10 jan. 2001.
13. AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v. 82, n. 2, p. 402-415, feb., 1999.
14. AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). OMB emphasizes limits of method applicability. **The Referee**, s.l. v. 17, n. 8, p. 3-7, 1993.
15. AOAC RI (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS RESEARCH INSTITUTE), 2002. **Qualicon Bax System for *Salmonella*. Certification Report of AOAC Research Institute - Performance Tested Method 100201**. Disponível em:
<<http://www.aoac.org/testkits/100201Salmonella%20Cert%20Report.pdf>>.
Acesso em 28 abr. 2003

16. BAILEY, J. S. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX System. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 792-795, jul., 1998.
17. 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**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 437-441, jun., 1998.
18. BENNETT, A. R.; MACPHEE, S.; BETTS, R.; POST, D. Use of pyrrolidonyl peptidase to distinguish *Citrobacter* from *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 175-178, mar., 1999.
19. BERSOT, L. S. Segurança alimentar – Cadeia produtiva de suínos e disseminação de *Salmonella*. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 10, n. 31, p. 15-20, jan./fev., 2004.
20. BEUTLER, B. Toll-Like Receptors and their place in immunology. **Nature Reviews in Immunology**, London, v. 4, n. 7, p. 498, July, 2004.
21. BRASIL. Decreto Federal nº 4.039 de 3 de dezembro de 2001. Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas do INMETRO. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 05 dez. 2001.
22. BRASIL. Lei Federal nº 5.966, de 11 de dezembro de 1973. Instituição do Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 12 dez. 1973.

23. BRASIL. Lei Federal nº 9.933, de 20 de dezembro de 1999. Dispõe sobre as competências do CONMETRO (Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 21 dez. 1999.
24. BRASIL. Portaria Conjunta INMETRO/IBAMA nº 66, de 17 de junho de 1997 – Programa Boas Práticas de Laboratório (BPL). In: **Diário Oficial da União**, seção 1.
25. BRASIL. Portaria nº 32, de 11 de março de 2002. Aprova o regimento interno do INMETRO. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília.
26. BRASIL. Portaria INMETRO nº 029, de 10 de março de 1995. Aprova nova versão do Vocabulário de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia. In: **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília.
27. BRAUN, P.; FEHLHABER, K. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 95-99, feb., 1995.
28. BRENNER, D. J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: KREIG, N. R. & HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore. Williams and Wilkens, 1984, vol. 1, p. 408-420.
29. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Infectious Disease Information: Salmonellosis**. Disponível em:
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm>
Acesso em 18 mar. 2005
30. CHIU, C. H.; WU, T. L.; SU, L. H.; LIU, J. W.; CHU, C. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis, Taiwan, 2000 – 2003. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 9, p. 1674-1676, Set., 2004.

31. COSTA, L. H. Protocolos de validación AOAC y armonización en la ISO – su impacto en el control microbiológico de alimentos. BioControl Systems Inc. In: CURSO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS - ITAL, Campinas, 2004. Não publicado.
32. CRICHTON, P. B.; HENRY, M. S.; OLD, D. C. Strain discrimination of a novel serotype of *Salmonella* from harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) by molecular techniques. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 61-69, May, 2000.
33. CVE/SP (Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo). 2001. **Informe-Net DTA - Doenças transmitidas por alimentos e água: Salmonella Enteritidis/Salmoneloses**. Disponível em:
<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dta_menu.htm> Acesso em 12 dez. 2004.
34. DAEFLER, S. Type III secretion by *Salmonella typhimurium* does not require contact with a eukaryotic host. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 31, n. 1, p. 45-51, jan., 1999.
35. DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 405-428, July, 1999.
36. DAVIES, M.A.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; RICE, D. H.; GAY, J. M.; GAY, C.; GEARHART, L.; DIGIACOMO, R. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in human and cattle in the Northwestern United States, 1982-1997. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, n. 6, p. 802-806, Nov./Dec., 1999.

37. DDTHA/CVE. Febre tifóide: 1960-2004. **Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – CVE/ SES - SP.** Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ft_04.zip. Acesso em 28 fev. 2005.
38. DE SMEDT, J.M. AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 25-28, feb., 1998.
39. DIESEL, C.; JORDAN, S.; ARCHER, J.; BARBOUR, W. M.; MROZINSKI, P.; BRISABOIS, A.; MOURY, F.; FREMY, S.; PIERSGOMES, C. **Evaluation of Bax® for screening *Salmonella*, a polymerase chain reaction-based assay, in comparison to culture-based methods**, 1999. Disponível em: www.qualicon.com/abstracts/abstr_3-1002.html acesso em: 29 mar. 2003.
40. DONNENBERG, M.S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**. London, v. 406, p. 768-774, Aug., 2000.
41. DRAKE, G. Objectives and roles of “accreditation” and “certification” of laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**. New York, v. 8, n. 9, p. 441, July, 2003.
42. DREAZEN, O. Accreditation of sampling activities. **Accreditation and Quality Assurance**. New York, v. 9, n. 7, p. 419-420, jul., 2004.
43. DUPONT/QUALICON **Manual do equipamento - A-BAX System®**. São Paulo, 2005.
44. Eduardo, M. B. P. Vigilância de Alimentos. **Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – CVE/ SES - SP.** Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/cvisaalest.ppt Acesso em 10 mar. 2005.

45. EL-GEDAILY, A. PAESOLD, G.; KRAUSE, M. Expression profile and subcellular location of the plasmid-encoded virulence (*spv*) proteins in wild-type *Salmonella* Dublin. **Infection and Immunity**. Washington, v. 65, n. 8, p. 3406-3411, Aug., 1997.
46. ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. Measurement uncertainty and its implications for collaborative study method validation and method performance parameters. **Accreditation and Quality Assurance**, New York,, v. 3, n. 1, p. 6-10, feb., 1998.
47. ENTIS, P., FUNG, Y.C., GRIFFITHS, M.W. ET AL., 2001. Rapid methods for detection, identification, and enumeration. **In: DOWNES, F. P., & ITO, K. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed., Washington, D. C.: American Public Health Association, 2001, Chapter 10, p. 89-126.
48. FDA (Food and Drug Administration). **Bacteriological Analytical Manual: Revision A**. 8th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998.
49. FDA (Food and Drug Administration). **Comparison chart of FDA and EPA Good laboratory Practice (GLP) Regulations and the OECD Principles of GLP**, 2004. Disponível em:
<http://www.fda.gov/oralcompliance_ref/bimo/comparison_chart/FDA-EPA-oecd2.pdf> acesso em 17 mar. 2005.
50. FDA/CFSAN. (Food and Drug Administration/ Center for Food Safety and Applied nutrition). **Food safety A to Z reference guide. Center for Food Safety & Applied nutrition**. 2001. Disponível em:
<<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/a2z-s.html>>. Acesso em 02 mar 2005.

51. FDA/CFSAN (Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied nutrition). **Salmonella spp – Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 1992. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>>. Acesso em 12 dez. 2004
52. FELDSINE, P. T., ABEYTA, C.; ANDREWS, W.H. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**. Arlington, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, 2002.
53. FELDSINE, P. T.; LIENAU, A. H.; LEUNG, S. C.; MUI, L. A. Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry products and dried egg products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC official method: collaborative study. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**. Arlington, v. 86, n. 2, p. 275-295, Mar./Apr., 2003.
54. FIERER, J.; ECKMANN, L.; FANG, I.; PFEIFFER, C. G.; FINLAY, B. B.; GUINEY, D. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophagos and nonphagocytic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 12, p. 5231-5235, Dec., 1993.
55. FORSTEN, J. Experience of implementing of ISO/IEC 17025: conclusions and recommendations of a workshop. **Accreditation and Quality Assurance**. New York, v. 7, n. 6, p. 234-236, jun., 2002.
56. FREUDENBERG, M.A.; MERLIN, T.; GUMENSCHHEIMER, M.; KALIS, C.; LANDMANN, R.; GALANOS, C. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. **Microbes and Infection**. Paris, v. 3, n. 14/15, p. 1213-1222, 2001.

57. GILLESPIE, B. E.; MATHEW, A. G.; DRAUGHON, F. A.; JAYARAO, B. M.; OLIVER, P. S. **PCR-ELISA procedure for identification of *Salmonella* serovars A, B, C1, C2 and D.** Disponível em: [<http://animalscience.ag.utk.edu/pdf/reports/salmonella%20PCR.pdf>](http://animalscience.ag.utk.edu/pdf/reports/salmonella%20PCR.pdf)
Acesso em 02 mar. 2005
58. GOOSNEY, D. L.; KNOECHEL, D. G.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal exploitation. **Emerging Infectious Disease**. Atlanta, v. 5. n. 2, Apr./June, p. 216-223, 1999.
59. GULIG, P.; DOYLE, T. J.; HUGHES, J. A.; MATSUI, H. Analysis of host cell associated with the *spv*-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 2471-2485, 1998.
60. HILL, W.E., DATTA, A.R., FENG, P., LAMPEL, K.A., PAYNE, W.L. Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes. In: BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 24. Disponível em: [<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html>](http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html). Acesso em 07 abr. 2003.
61. HOCHBERG, A. M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W. M.; MROZINSKI, P. M. Sensitivity and specificity of the BAX® for screening/*Listeria monocytogenes* assay: internal validation and independent laboratory study. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v. 84, n. 4, p. 1087-1097, apr., 2001.
62. HOLMGREN, M. Validation of test methods. **Accreditation and Quality Assurance**. New York, v. 3, n. 1, p. 29-32, feb., 1998.

63. HONSA, J. D.; MCINTYRE, D. A. ISO 17025: practical benefits of implementing a quality system. **Journal of Association of Analytical Chemists International**. Arlington,, v. 86, n. 5, p. 1038-1044, Sep./Oct., 2003.
64. IANKOV, I. D.; PETROV, D. P.; MLANDENOV, I. V.; HARALAMBICVA, I. H.; KALEV, O. K.; BALABANOVA, M. S.; MITOV, I. G. Protective efficacy of IgA monoclonal antibodies to O and H antigens in a mouse model of intranasal challenge with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Microbes and Infection**. Paris, v. 6, n. 6, p. 601-910, July, 2004.
65. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, normalização e Qualidade Industrial). **Acreditação (credenciamento) pelo Inmetro**, 2005. Disponível em:
<<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/fluxograma.asp>>. Acesso em 14 mar. 2005
66. INMETRO/CGCRE (1). **DOQ-CGCRE-001: Orientações sobre o credenciamento de laboratórios de calibração e de ensaios**. Junho, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em 14 mar. 2005.
67. INMETRO/CGCRE (2). **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Março, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> . Acesso em 14 mar.2005.
68. ISO (International Organization for Standartization). **Why standers matter**. 2005. Disponível em:
<<http://www.iso.org/iso/en/aboutiso/introduction/index.html>>. Acesso em 14 mar. 2005.

69. ISO (International Organization for Standardization). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, ISO 16140**. First edition. ISO, Geneva, Switzerland, 2003.
70. IWAOKA, T. Compliance with GLP standards and management in analytical laboratories: current status. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 2, n. 3, p. 146-149, Sep., 1997.
71. JENNY, R. W.; TARENTINO, K. Y. J. Causes of unsatisfactory performance in proficiency testing. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 89-99, jan., 2000.
72. JEPSON, M. A.; CLARK, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 14-15, p. 1183-1190, 2001.
73. KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, G. M. P.; GARCIA, K. I.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 127-131, 1995.
74. KICH, J. D.; CARDOSO, M. **Salmonella em suínos: segurança alimentar e situação no sul do Brasil**. Embrapa – suínos e aves. 2004. Disponível em:
<<http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2004/artigo-2004-n022.html>>
Acesso em 24 fev. 2005.
75. KOHL, H. The new ISO 17025 – Basic idea. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 3, n. 10, p. 422-425, oct., 1998.
76. KOWARZ, L.; COYNALT, C.; ROBBE-SAULE, V.; NOREL, F. The *Salmonella typhimurium* katF (rpoS) gene: cloning nucleotide sequence and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 22, p. 6852-6860, Nov., 1994.

77. KRAGTEN, J. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spread-sheet technique. **Analyst**, London, v. 199, p. 2161-2166, 1994.
78. KUBORI, T.; SUKHAN, A.; QAIZAWA, S. I., GÁLAN, J. E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 10225-10230, 2000.
79. LARSEN, T. OECD's work on Good Laboratory Practice (GLP) and compliance monitoring. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 7, n. 8-9, p. 372, aug., 2002.
80. LAUWAARS, M. Methods validation: AOAC's three validation systems. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 3, n. 1, p. 32-35, jan., 1998.
81. LAUWAARS, M.; ANKLAM, E. Method validation and reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 9, n. 4-5, p. 253-258, apr., 2004.
82. LEEMPUT, J. H. A. M. VAN DE. ISO/IEC 17025:1999 – The new standard for laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 5, n. 9, p. 394-397, sep., 2000.
83. LEVINE, M. M.; TACKER, C. O.; SZTEIN, M. B. Host – *Salmonella* interaction: human trials. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 14-15, p. 1271 – 1279, 2001.
84. LIBBY, S.J., ADAMS, L. G.; FICHT T. A.; ALLEN, C.; WHITFORD, H. A.; BUCHMEIER N. A.; BOSSIE, S.; GUINEY, D. G. The *spv* genes on the *Salmonella* Dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in natural host. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 5, p. 1786-1792, May, 1997.

85. LOCO, J. V.; MOERENHOUT, M.; BEERNAERT, H. Strategies for multi-site GLP studies. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 8, n. 2, p. 61 – 67, Nov., 2003.
86. MAJEEN, N. A. Need for clear terminology and guidance in the role of reference materials in method development and validation. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 8, n. 3-4, p. 108-112, mar., 2003.
87. MARCUS, S. L.; BRUMELLA, J.H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 2, p. 145-156, feb., 2000.
88. MASTROENI, P.; SHEPPARD, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 4, p. 398-405, apr., 2004.
89. MCCLURE, F.D. Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. **Journal of Association of the Analytical Chemists International**, Arlington, v. 73, p. 953-960, 1990.
90. MDIC (Ministério do desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior) **Competências**. 2005. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/ministerio/ministerio/competencia.php> . Acesso em 14 mar. 2005.
91. MEDZHITOV, R. Toll-Like Receptors and innate immunity. **Nature Reviews in Immunology**, London, v. 1, n. 11, p. 435-445, Nov., 2001.
92. MELLO JÚNIOR, A. S. Considerações importantes durante o processamento de carcaças suínas. **Revista Nacional da Carne**, v. 326, abril, 2004. Disponível em: http://www.dipemar.com.br/carne/326/materia_especial3_carne.htm > acesso em 18 mar. 2005

93. MROZINSKI, P. M.; BETTS, R. P.; COATES, S. Performance Tested Method certification of BAX™ for screening/*Salmonella*: a case study. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v. 81, n. 6, p. 1147-1154, jun., 1998.
94. MUKHERJEE, K.; PARASHURAMAN, S.; KRISHNAMURTHY, G.; MAJUNDAR, J.; YADAV, A.; KUMAR, R.; BASU, S. K.; MUKHOPADHYAY, A. Diverting intracellular trafficking of *Salmonella* to the lysosomes through activation of the endocytic Rab7 by intracellular delivery of muramyl dipeptide. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, n. 18, p. 3693-3701, 2002.
95. NASCIMENTO, V. P.; PONTES, A. P. Salmonelose – a tecnologia do DNA como ferramenta de controle. **Revista Sanidade Avícola, UFRGS**, disponível em: <www.avisite.com.br/cet/1/12/index.shtm> Acesso em 13 fev. 2005.
96. NORRIS, F. A.; WILSON, M. P.; WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E.; MAJERUS, P. W. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 14057-14059, Nov., 1998.
97. OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). **Guidance for GLP monitoring authorities - Revised guides for compliance monitoring procedures for Good Laboratory Practices – Environment Monograph n^o 110**, 1995. Disponível em: [http://www.olis.oecd.org/olis/1995doc.nsf/dd3491a17c199db2c12569fa005d35af/b2f38589511f0ae9c12561db004da6a6/\\$FILE/ENE51287.ENG](http://www.olis.oecd.org/olis/1995doc.nsf/dd3491a17c199db2c12569fa005d35af/b2f38589511f0ae9c12561db004da6a6/$FILE/ENE51287.ENG). Acesso em 17 mar. 2005.

98. OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Reviews of Medicine**, Palo Alto, v. 52, p. 259-274, feb., 2001.
99. OLSEN, S.J., MACKINON, L.C., GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar., 2000.
100. O'NEILL, L. A. Estopim imunológico. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 3, n. 33, p. 68-75, Fev., 2005.
101. OSCAR, T. **Enumeration of Salmonella with the PolymeraseChain Reaction BAX System and simulation modeling. Meeting Abstract**, 2003, p. 119-120, Disponível em: www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no115=143018 . Acesso em 16 set. 2004.
102. O'SULLIVAN, D.J. Methods for the analysis of intestinal microflora. In: TANNOCK, G.W. (Ed.) **Probiotics: a Critical Review**,. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999. cap.3.
103. PANICO, M. G.; PRIMIANO, F.; NAPPI, F.; ATTENA, F. Um surto de intoxicaçãoalimentar por *Salmonella* Enteritidis com origem em queijo produzido para comércio. **Eurosurveillance Monthly Archives**. v. 4, n. 4, p. 47-48, abr. 1999. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/em/v04n04/0404-423.asp?langue=04&> . Acesso em 19 nov. 2003.
104. PARKER, C. T.; GUARD-PETTER, J. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicks. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 204, n. 2, p. 287-291, Nov., 2001

105. PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T. G.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; Ó'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, London, v. 413, p. 848-852, Oct., 2001.
106. PRITZKOW, J. Practical experience of the laboratories in implementing the ISO/IEC 17025. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 8, n. 1, p. 25-26, 2003.
107. RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A. J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems – Review. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 3, p. 267-247, mar., 2001.
108. REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; HEIBA, A. A.; PLIKAYTIS, B. D.; FARMER III, J. J. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as show by Multilocus Enzyme Eletroforesis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 2, p. 313-320, Feb., 1989.
109. RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G. BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAENBUHL, J. P.; CASTAGNOLI, P. R. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayer to sample bacteria. **Nature Reviews in Immunology**, London, v. 2, n. 4, p. 361-367, Apr., 2001.

110. SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. Porto Alegre, v. 29, n. 2, p. 87-92, fev., 2001.
111. SCHOENI, J.I.; GLASS, K. A.; MCDERMOTT, J. L.; WONG, A. C. L. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 385-396, jan., 1995.
112. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2^o edição. 2001, 317 p.
113. SILBERNAGEL, K.; JECHOREK, R.; CARVER, C. Evaluation of the BAX System for detection of Salmonella in selected foods: Collaborative study. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v. 86, n. 6, p. 1149-1159, jun., 2003.
114. SINGER, V. L.; LAWLOR, T. E.; YUE, S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 439, n. 1, p. 37-47, Feb., 1999.
115. SOLARI, C. A.; MANDARINO, J. R.; PANIZZUTTI, M. M.; FARIAS, R. H. G. A New Serovar and a New Serological Variant Belonging to *Salmonella enterica* Subspecies Diarizonae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 501-502, jun., 2003.

116. STEWART, D. S.; REINEKE, K. F.; TORTORELLO, M. L. Comparisson of assurance Gold *Salmonella* EIA, BAX for screening of *Salmonella*, and GENE-TRACK *Salmonella* DLP rapid assays for detection of *Salmonella* in alfafa sprouts and sprout irrigation water. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v.85, n. 2, p. 395-403, feb., 2002.
117. SUINOCULTURA INDUSTRIAL. **Boehringer Ingelheim lança primeira vacina viva para *Salmonella***. Disponível em: [<www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=10620&tipo_tabela=cet&categoria=saude_animal>](http://www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=10620&tipo_tabela=cet&categoria=saude_animal). Acesso em 11 mar. 2005.
118. TERRAGNO, R.; CAFFER, M. I. BRUNO, S.; BINSZTEIN, N. ***Salmonella*: Aislamento, Identificación y Serotipificación**. In: **Manual de Procedimientos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamiento de Bacteriología**. Global Salm-Surv, 46p. 2003. Buenos Aires. Argentina. Disponível em: [<http://www.panalimentos.org/salmsurv/docs/manual/PARTE%201.pdf>](http://www.panalimentos.org/salmsurv/docs/manual/PARTE%201.pdf) Acesso em 18 fev. 2005.
119. URUEÑA, A. C. **Diagnóstico serológico de salmonelosis**. **Departamiento de Sanidad Animal, Universidad de León**, Octubre, 2003. Disponível em: [<www.exopol.com/general/circulares/257.html>](http://www.exopol.com/general/circulares/257.html) Acesso em 19 fev. 2005.
120. VAILLANT, V.; HAEGHEBAERT, S.; DESENCLOS, J. C.; BOUVET, P.; GRIMONT, P. A.; BURNENS, P. A. Relatório de vigilância: Surto de infecção por *Salmonella* Dublin na França em novembro/dezembro de 1995. **Eurosurveillance Monthly Archives**. v. 1, n. 2, p. 9-10, fev., 1996. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/em/v01n02/0102-421.asp?langue=04> >. Acesso em 19 fev. 2005.

121. VALLE, G. J. **NBR ISO/IEC 17025:2001 – Interpretação e Implantação.**
In: Treinamento junto ao ITAL no processo de implantação da ISO 17025 em 08, 09, 26 e 29 de janeiro de 2004.
122. VALDEZ, F. G. C.; ABUXAPQUI, J. J. F.; FRANCO, M. A. P.; NAVARRETE, M. R. H. Freqüência del gen *spvB* en cepas de *Salmonella* spp aisladas de niños con y sin diarrea. **Revista Biomédica**, Yucatán, v. 15, n. 4, p. 201-206, oct./dic., 2004.
123. VEKRELLIS, K.; MCCARTHY, M. J.; WATSON, A.; WHITFIELD, J. RUBIN, L. L.; HAM, J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 1239-1249, 1997.
124. YANG, R. B.; MARK, M. R.; GRAY, A.; HUANG, A.; XIE, M. H.; ZHANG, M.; GODDARD, A.; WOOD, W. I.; GURNEY, A. L.; GODOWSKI, P. J. Toll-Like Receptor-2 mediates lipopolysaccharide – induced cellular signaling. **Nature**, London v. 395, p. 284-288, Sep., 1998.
125. WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 36, n. 5, p. 997-1005, jun., 2000.
126. WILLIAMS, A. Measurement uncertainty in analytical chemistry. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 1, n. 1, p. 14-17, jan., 1996.
127. WITTEWER, C. T.; HERMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescent monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, Natick, v. 22, n. 1, p. 130-131, 134-138, Jan., 1997.

128. ZIPPRIN, R. L.; HUME, M. H. Human salmonellosis: General medical aspects. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (ed.). **Food Born Disease Handbook: Bacterial Pathogens**, 2nd edition. USA: Marcel Dekker, 2001, v. 1, p. 285-321.

ANEXOS:

Anexo 1: Amostras de frutas, produtos de frutas e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	433 01 MB-0850/04	Abacaxi liofilizado	-	PL (0)	-	--
2.	434 01 MB-0851/04	Manga liofilizada	-	SR (6/12/12)	-	--
3.	183 02 MB-8700/03	Frutas desidratadas	-	PL (0)	-	--
4.	184 02 MB-8701/03	Frutas liofilizadas	-	PL (0)	-	--
5.	435 01 MB-0852/04	Banana liofilizada	-	SR (4/8/8)	-	--
6.	525 01 MB-1888/04	Laranja pera	-	PL (0)	-	--
7.	526 01 MB-1889/04	Limão	-	PL (0)	-	--
8.	527 01 MB-1890/04	Lima verde	-	PL (0)	-	--
9.	600 01 MB-M2	Caqui	-	PL (0)	-	--
10.	601 01 MB-S2	Caqui	-	PL (0)	-	--
11.	602 01 MB-I1	Caqui	-	PL (0)	-	--
12.	603 01 MB-C	Caqui	-	PL (0)	-	--
13.	604 01 MB-F	Caqui	-	PL (0)	-	--
14.	605 01 MB-L2	Caqui	-	PL (0)	-	--
15.	606 01 MB-L1	Caqui	-	PL (0)	-	--
16.	607 01 MB-D2	Caqui	-	PL (0)	-	--
17.	608 01 MB-H1	Caqui	-	PL (0)	-	--
18.	609 01 MB-S1	Caqui	-	PL (0)	-	--
19.	610 01 MB-M1	Caqui	-	PL (0)	-	--
20.	611 01 MB-I2	Caqui	-	PL (0)	-	--
21.	612 01 MB-G	Caqui	-	PL (0)	-	--
22.	613 01 MB-H2	Caqui	-	PL (0)	-	--
23.	614 01 MB-D1	Caqui	-	PL (0)	-	--
24.	615 01 MB-E1	Caqui	-	PL (0)	-	--
25.	616 01 MB-E2	Caqui	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 2: Amostras de hortaliças, legumes, raízes, tubérculos e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	91	02 MB-7893/03	Tomate seco	-	PL (0)	-	--
2.	102	02 MB-8016/03	Extrato concentrado de legumes	-	PL (0)	-	--
3.	232	02 MB-9114/03	Gengibre	-	PL (0)	-	--
4.	239	02 MB-9215/03	Aipo granulado desidratado	-	PL (0)	-	--
5.	240R	02 MB-9216/03	Tomate granulado desidratado	-	PL (0)	-	--
6.	241	02 MB-9219/03	Pimentão verde em flocos	-	PL (0)	-	--
7.	242	02 MB-9220/03	Pimentão verde em grãos desidratado	-	PL (0)	-	--
8.	243	02 MB-9221/03	Pimentão vermelho desidratado	-	PL (0)	-	--
9.	244	02 MB-9222/03	Pimentão em flocos desidratado	-	PL (0)	-	--
10.	248	02 MB-9302/03	Vegetais crus em vinagre	-	PL (0)	-	--
11.	249	02 MB-9304/03	Escarola "in natura" fatiada	-	BQ (/ /)	-	--
12.	273	02 MB-9506/03	Cenoura em rodela	-	PL (0)	-	--
13.	274	02 MB-9507/03	Alface crespa	-	PL (0)	-	--
14.	282	02 MB-9704/03	Berigela em conserva	-	PL (0)	-	--
15.	283	02 MB-9719/03	Beterraba palha	-	PL (0)	-	--
16.	284	02 MB-9720/03	Repolho	-	PL (0)	-	--
17.	331	02 MB-9937/03	Farinha de banana	-	SR(2/4/4)	-	--
18.	332	02 MB-0082/04	Alface americana	-	API 20E (2/4/1)	-	--
19.	333	02 MB-0083/04	Alface americana	-	SR (2/4/2)	-	--
20.	364	02 MB-0366/04	Alface crespa	-	SR (3/6/3)	-	--
21.	365	02 MB-0367/04	Escarola	-	API 20E (4/8/1)	-	--
22.	366	02 MB-0368/04	Catalonha	-	SR (3/6/6)	-	--
23.	406	02 MB-0645/04	Alface americana	-	SR (3/6/6)	-	--
24.	407	02 MB-0646/04	Alface americana	-	SR (3/6/6)	-	--
25.	408	02 MB-0647/04	Alface americana	-	SR (2/4/4)	-	--
26.	409	02 MB-0648/04	Rúcula	-	SR (3/6/6)	-	--
27.	461	02 MB-1090/04	Repolho minimamente processado	-	TSI (2/4/4)	-	--
28.	462	02 MB-1091/04	Alface	-	TSI (2/4/4)	-	--
29.	470	02 MB-1246/04	Alface americana	-	SR (4/8/8)	-	--
30.	532	02 MB-2027/04	Tomate desidratado em óleo	-	PL (0)	-	--
31.	549	02 MB-2290/04	Tomate seco	-	PL (0)	-	--
32.	575	02 MB-3518/04	Alface Jatobá	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

MB-0082/04 – cepa identificada: *Citrobacter youngae*

MB-0367/04 – cepa identificada: *Citrobacter braaki*

Anexo 3: Amostras de cogumelos

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	1 02f MB-4847/03	Cogumelo seco	-	API (2/2/2)*	-	--
2.	26 02f MB-5316/03	Cogumelo seco	-	SR (3/3/3)*	-	--
3.	27 02f MB-5317/03	Cogumelo seco	-	SR (2/2/1)*	-	--
4.	28 02f MB-5318/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
5.	29 02f MB-5319/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
6.	30 02f MB-5320/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
7.	31 02f MB-5321/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
8.	32 02f MB-5322/03	Cogumelo seco	-	PL (0)	-	--
9.	33 02f MB-5323/03	Cogumelo seco	-	SR (2/2/2)*	-	--
10.	34 02f MB-5324/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
11.	35 02f MB-5325/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
12.	36 02f MB-5326/03	Cogumelo seco	-	SR (4/4/3)*	-	--
13.	37 02f MB-5327/03	Cogumelo seco	-	TSI (2/2/2)*	-	--
14.	80 02f MB-6682/03	Cogumelo seco	-	SR (6/12/12)	-	--
15.	81 02f MB-6684/03	Cogumelo seco	-	BQ (3/6/2)	-	--
16.	192 02f MB-8725/03	Cogumelo seco	-	PL (0)	-	--
17.	193 02f MB-8726/03	Cogumelo seco	-	PL (0)	-	--
18.	194 02f MB-8727/03	Cogumelo seco	-	PL (0)	-	--
19.	195 02f MB-8728/03	Cogumelo seco	-	PL (0)	-	--
20.	238 02f MB-9214/03	Cogumelos desidratados fatiados	-	TSI (4/8/8)	-	--
21.	358 02f MB-0356/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/4)	-	--
22.	359 02f MB-0357/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/4)	-	--
23.	360 02f MB-0359/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/4)	-	--
24.	361 02f MB-0360/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/4)	-	--
25.	362 02f MB-0361/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/4)	-	--
26.	363 02f MB-0363/04	Cogumelo seco	-	SR (2/4/1)	-	--
27.	550 02d MB-2350/04	Cogumelo no vinagre	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

MB-4847/03 – cepa identificada: *Enterobacter cloacae*

Anexo 4: Amostras de sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX	
			Resultado	Etapa finalização	Resultado		
1.	52 17	MB-5737/03	Suco de maçã	-	PL (0)	-	--
2.	94 17	MB-7938/03	Água coco	-	PL (0)	-	--
3.	95 17	MB-7939/03	Suco de milho	-	SR (1/2/2)	-	--
4.	96 17	MB-7951/03	Suco laranja concentrado congelado	-	PL (0)	-	--
5.	97 17	MB-7952/03	Suco laranja concentrado congelado	-	PL (0)	-	--
6.	206 17	MB-8825/03	Suco de laranja integral	-	PL (0)	-	--
7.	207 17	MB-8829/03	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
8.	208 17	MB-8830/03	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
9.	214 17	MB-8849/03	Preparado p/ refresco sabor cajú	-	PL (0)	-	--
10.	215 17	MB-8850/03	Preparado p/ refresco sabor tangerina	-	PL (0)	-	--
11.	216 17	MB-8851/03	Preparado p/ refresco sabor manga	-	PL (0)	-	--
12.	254 17	MB-9352/03	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
13.	271 17	MB-9456/03	Suco de laranja integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
14.	275 17	MB-9510/03	Suco de milho	-	PL (0)	-	--
15.	280 17	MB-9679/03	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
16.	281 17	MB-9680/03	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
17.	339 17	MB-0114/04	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
18.	340 17	MB-0115/04	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
19.	417 17	MB-0693/04	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
20.	447 17	MB-1045/04	Suco de laranja integral resfriado	-	PL (0)	-	--
21.	473 17	MB-1249/04	Suco laranja concentrado congelado	-	PL (0)	-	--
22.	491 17	MB-1426/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
23.	492 17	MB-1427/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
24.	493 17	MB-1428/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
25.	494 17	MB-1429/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
26.	495 17	MB-1434/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
27.	496 17	MB-1435/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
28.	497 17	MB-1436/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
29.	498 17	MB-1437/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
30.	499 17	MB-1438/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
31.	500 17	MB-1439/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
32.	501 17	MB-1440/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
33.	502 17	MB-1441/04	Repositor hidrolítico	-	PL (0)	-	--
34.	528 17	MB-1910/04	Suco de laranja concentrado	-	PL (0)	-	--
35.	674 17	MB-3769/04	Suco de laranja	-	PL (0)	-	--
36.	685 17	MB-3732/04	Extrato de guaraná	-	PL (0)	-	--
37.	686 17	MB-3943/04	Repositor hidroelétrico	-	PL (0)	-	--
38.	687 17	MB-3944/04	Repositor hidroelétrico	-	PL (0)	-	--
39.	688 17	MB-3945/04	Citrus emulsão	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 5: Amostras de especiarias, temperos, condimentos, molhos preparados e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	185 15 MB-8702/03	Corante urucum	-	PL (0)	-	--
2.	186 15 MB-8703/03	Corante urucum	-	PL (0)	-	--
3.	187 15 MB-8704/03	Corante urucum	-	PL (0)	-	--
4.	224 15 MB-9014/03	Molho p/ salada sabor queijo	-	PL (0)	-	--
5.	230 15 MB-9112/03	Orégano desidratado	-	PL (0)	-	--
6.	231 15 MB-9113/03	Pasta de salsa e cebolinha verde	-	PL (0)	-	--
7.	233 15 MB-9115/03	Noz moscada	-	PL (0)	-	--
8.	234 15 MB-9116/03	Pimenta do reino preta em grãos	-	PL (0)	-	--
9.	235 15 MB-9117/03	Pimenta do reino preta em pó	-	PL (0)	-	--
10.	236 15 MB-9118/03	Pimenta do reino branca em grãos	-	PL (0)	-	--
11.	237 15 MB-9119/03	Pimenta do reino branca em pó	-	PL (0)	-	--
12.	240 15 MB-9216/03	Pimenta do reino preta em grãos	-	PL (0)	-	--
13.	245 15 MB-9223/03	Aipo granulado desidratado	-	PL (0)	-	--
14.	404 15 MB-0562/04	Maionese em sache 8 g	-	PL (0)	-	--
15.	410 15 MB-0655/04	Glutamato de sodio	-	PL (0)	-	--
16.	460 15 MB-1085/04	Polpa de tomate	-	PL (0)	-	--
17.	512 15 MB-1591/04	Produto em pó a base de aminoácidos	-	PL (0)	-	--
18.	560 15 MB-2477/04	Pasta de alho 50%	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 6: Amostras de açúcar, adoçantes e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	103 11 MB-8022/03	Açúcar cristal	-	PL (0)	-	--
2.	104 11 MB-8025/03	Açúcar mascavo	-	PL (0)	-	--
3.	154 11 MB-8446/03	Açúcar mascavo	-	PL (0)	-	--
4.	159 11 MB-8465/03	Açúcar mascavo	-	BQ (6/12/7)	-	--
5.	160 11 MB-8466/03	Açúcar mascavo	-	PL (0)	-	--
6.	218 11 MB-8913/03	Açúcar cristal	-	PL (0)	-	--
7.	347 11 MB-0227/04	Açúcar	-	PL (0)	-	--
8.	355 11 MB-0319/04	Açúcar cristal	-	PL (0)	-	--
9.	356 11 MB-0320/04	Açúcar refinado	-	PL (0)	-	--
10.	514 11 MB-1615/04	Açúcar líquido invertido	-	PL (0)	-	--
11.	561 11 MB-2832/04	Açúcar refinado	-	PL (0)	-	--
12.	574 11 MB-3515/04	Açúcar cristal	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 7: Amostras de produtos a serem consumidos após adição de líquido com emprego de calor

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	92 12 MB-7911/03	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
2.	93 12 MB-7912/03	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
3.	138 12 MB-8264/03	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
4.	139 12 MB-8265/03	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
5.	140 12 MB-8266/03	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
6.	175 12 MB-8630/03	Gelatina	-	SR	-	--
7.	228 12 MB-9028/03	Café Capuccino	-	PL (0)	-	--
8.	276 12 MB-9561/03	Gelatina	-	PL (0)	-	--
9.	277 12 MB-9562/03	Gelatina	-	PL (0)	-	--
10.	464 12 MB-1177/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
11.	465 12 MB-1178/08	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
12.	466 12 MB-1179/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
13.	467 12 MB-1180/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
14.	468 12 MB-1181/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
15.	469 12 MB-1182/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
16.	471 12 MB-1263/04	Mistura alimentícia em pó	-	PL (0)	-	--
17.	521 12 MB-1859/04	Mistura para bolo sabor laranja	-	PL (0)	-	--
18.	522 12 MB-1860/04	Mistura para bolo sabor chocolate	-	PL (0)	-	--
19.	523 12 MB-1861/04	Mistura para bolo sabor baunilha	-	PL (0)	-	--
20.	524 12 MB-1862/04	Mistura para bolo sabor coco	-	PL (0)	-	--
21.	540 12 MB-2079/04	Gelatina pura 3 semanas	-	PL (0)	-	--
22.	541 12 MB-2080/04	Gelatina pura 8 semanas	-	PL (0)	-	--
23.	551 12 MB-2375/04	Café torrado e moído extra forte	-	PL (0)	-	--
24.	568 12 MB-3047/04	Café solúvel	-	PL (0)	-	--
25.	569 12 MB-3136/04	Pó base de mate, chocolate e leite	-	PL (0)	-	--
26.	573 12 MB-3509/04	Gelatina em pó	-	PL (0)	-	--
27.	671 12 MB-3752/04	Café torrado e moído – S1	-	TSI	-	--
28.	672 12 MB-3753/04	Café torrado e moído – S2	-	TSI	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 8: Amostras de petiscos e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	87 14 MB-6826/03	Castanha caju torrada	-	TSI (6/12/12)	-	--
2.	88 14 MB-6827/03	Castanha caju torrada	-	SR (6/12/12)	+++	- +
3.	124 14 MB-8147/03	Castanha de caju granulada torrada	-	PL (0)	-	--
4.	125 14 MB-8148/03	Castanha de caju granulada torrada	-	TSI (2/4/4)	-	--
5.	126 14 MB-8149/03	Castanha de caju granulada torrada	-	PL (0)	-	--
6.	127 14 MB-8150/03	Castanha de caju granulada torrada	-	PL (0)	-	--
7.	128 14 MB-8151/03	Castanha de caju granulada torrada	-	PL (0)	-	--
8.	167 14 MB-8556/03	Castanha de caju granulada e torrada	-	PL (0)	-	--
9.	168 14 MB-8557/03	Castanha de caju granulada e torrada	-	TSI (2/4/4)	-	--
10.	169 14 MB-8558/03	Castanha de cajú	-	PL (0)	-	--
11.	295 14 MB-9842/03	Salgadinho sabor pizza	-	PL (0)	-	--
12.	296 14 MB-9843/03	Salgadinho sabor camarão	-	PL (0)	-	--
13.	297 14 MB-9844/03	Salgadinho sabor cebola	-	PL (0)	-	--
14.	298 14 MB-9845/03	Salgadinho sabor queijo	-	PL (0)	-	--
15.	299 14 MB-9846/03	Salgadinho sabor churrasco	-	PL (0)	-	--
16.	300 14 MB-9847/03	Salgadinho sabor churrasco	-	PL (0)	-	--
17.	301 14 MB-9848/03	Salgadinho sabor cebola	-	PL (0)	-	--
18.	302 14 MB-9849/03	Salgadinho sabor pizza	-	PL (0)	-	--
19.	303 14 MB-9850/03	Salgadinho sabor camarão	-	PL (0)	-	--
20.	304 14 MB-9851/03	Salgadinho sabor queijo	-	PL (0)	-	--
21.	313 14 MB-9894/03	Salgadinho sabor pizza	-	SR	-	--
22.	314 14 MB-9896/03	Salgadinho sabor cebola	-	SR	-	--
23.	315 14 MB-9897/03	Salgadinho sabor camarão	-	API	-	--
24.	316 14 MB-9898/03	Salgadinho sabor churrasco	-	SR	-	--
25.	317 14 MB-9899/03	Salgadinho sabor queijo	-	TSI	-	--
26.	318 14 MB-9900/03	Salgadinho sabor churrasco	-	TSI	-	--
27.	319 14 MB-9901/03	Salgadinho sabor cebola	-	TSI	-	--
28.	320 14 MB-9902/03	Salgadinho sabor queijo	-	SR	-	--
29.	321 14 MB-9903/03	Salgadinho sabor camarão	-	SR	-	--
30.	322 14 MB-9904/03	Panificação - Salgadinho sabor queijo	-	SR	-	--
31.	323 14 MB-9905/03	Salgadinho sabor camarão	-	PL (0)	-	--
32.	324 14 MB-9906/03	Salgadinho sabor pizza	-	SR	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 9: Amostras de chocolates, balas, gomas de mascar e produtos de confeitaria

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	246 19 MB-9280/03	Mistura para sorvete sabor chocolate	-	SR (4/8/4)	-	--
2.	247 19 MB-9295/03	Cobertura de chocolate	-	PL (0)	-	--
3.	338 19 MB-0089/04	Doce em massa de batata doce	-	BQ (1/2/1)	-	--
4.	428 19 MB-0775/04	Chicle de bola	-	TSI (2/4/4)	-	--
5.	432 19 MB-0843/04	Achocolatado em pó	-	PL (0)	-	--
6.	472 19 MB-1289/04	Marschmallow	-	PL (0)	-	--
7.	531 19 MB-2091/04	Achocolatado em pó	-	PL (0)	-	--
8.	543 19 MB-2091/04	Achocolatado em pó	-	PL (0)	-	--
9.	556 19 MB-2457/04	Doce sabor de morango	-	PL (0)	-	--
10.	562 19 MB-2912/04	Achocolatado vitaminado	-	PL (0)	-	--
11.	563 19 MB-2913/04	Achocolatado diet	-	PL (0)	-	--
12.	566 19 MB-2919/04	Bombom coberto com chocolate	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 10: Amostras de refeições prontas para consumo (restaurantes)

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	367	22 MB-0369/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
2.	368	22 MB-0370/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
3.	369	22 MB-0371/04	Picadinho de carne	-	PL (0)	-	--
4.	370	22 MB-0372/04	Salada de alface	-	PL (0)	-	--
5.	371	22 MB-0373/04	Purê de batata	-	PL (0)	-	--
6.	372	22 MB-0374/04	Arroz	-	TSI (4/8/8)	-	--
7.	373	22 MB-0375/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
8.	374	22 MB-0376/04	Picadinho de batata e cenoura	-	TSI (2/4/4)	-	--
9.	375	22 MB-0377/04	Salada de almeirão	-	PL (0)	-	--
10.	376	22 MB-0378/04	Carnes cozida (Cassoulet)	-	PL (0)	-	--
11.	377	22 MB-0379/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
12.	378	22 MB-0380/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
13.	379	22 MB-0381/04	Farofa	-	PL (0)	-	--
14.	380	22 MB-0382/04	Batata cozida ao vinagrete	-	PL (0)	-	--
15.	381	22 MB-0383/04	Lombo grelhado	-	PL (0)	-	--
16.	382	22 MB-0385/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
17.	383	22 MB-0386/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
18.	384	22 MB-0387/04	Farofa	-	PL (0)	-	--
19.	385	22 MB-0388/04	Doce bombocado	-	PL (0)	-	--
20.	386	22 MB-0389/04	Creme de milho	-	PL (0)	-	--
21.	387	22 MB-0390/04	Filé de frango frito	-	PL (0)	-	--
22.	388	22 MB-0391/04	Salada de pepino	-	PL (0)	-	--
23.	389	22 MB-0392/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
24.	390	22 MB-0393/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
25.	391	22 MB-0394/04	Peixe a dore	-	PL (0)	-	--
26.	392	22 MB-0395/04	Legumes soute	-	PL (0)	-	--
27.	393	22 MB-0396/04	Salada de acelga	-	PL (0)	-	--
28.	394	22 MB-0397/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
29.	395	22 MB-0398/04	Feijão	-	PL (0)	-	--

Anexo 10: Continuação

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
30.	396	22 MB-0399/04	Polenta	-	PL (0)	-	--
31.	397	22 MB-0400/04	Salada de beterraba	-	PL (0)	-	--
32.	398	22 MB-0401/04	Frango frito	-	PL (0)	-	--
33.	399	22 MB-402/04	Arroz	-	PL (0)	-	--
34.	400	22 MB-403/04	Feijão	-	PL (0)	-	--
35.	401	22 MB-404/04	Moela de frango cozida	-	PL (0)	-	--
36.	402	22 MB-405/04	Cenoura refogada	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 11: Amostras de alimentos infantis

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX	
			Resultado	Etapa finalização	Resultado		
1.	60 25	MB-6292/03	Dieta enteral soya	-	TSI	-	--
2.	61R 25	MB-6293/03	Dieta enteral "Nan"	-	TSI (4/4/4)*	-	--
3.	62R 25	MB-6294/03	Dieta enteral "PN"	-	TSI (4/4/4)*	-	--
4.	90 25	MB-7887/03	Bebida láctea NAN	-	PL (0)	-	--
5.	188 25	MB-8712/03	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
6.	189 25	MB-8713/03	Bebida láctea NAN 1	-	PL (0)	-	--
7.	190 25	MB-8714/03	Dieta enteral enfamil prematuros	-	PL (0)	-	--
8.	267 25	MB-9443/03	Bebida láctea NAN 1	-	PL (0)	-	--
9.	268 25	MB-9444/03	Bebida láctea Enfamil	-	PL (0)	-	--
10.	269 25	MB-9447/03	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
11.	270 25	MB-9448/03	Dieta enteral Resource diabetics	-	PL (0)	-	--
12.	292 25	MB-9810/03	Bebida lactea – Nan 1	-	PL (0)	-	--
13.	293 25	MB-9811/03	Bebida láctea – Enfamil prematuro	-	PL (0)	-	--
14.	294 25	MB-9812/03	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
15.	341 25	MB-0174/04	Bebida lactea Nan 1	-	SR (4/8/8)	-	--
16.	342 25	MB-0175/04	Bebida lactea Nan 1	-	PL (0)	-	--
17.	343 25	MB-0176/04	Dieta enteral Enfamil prematuro	-	PL (0)	-	--
18.	344 25	MB-0177/04	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
19.	429 25	MB-0834/04	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
20.	430 25	MB-0835/04	Dieta enteral NAN 1	-	PL (0)	-	--
21.	431 25	MB-0837/04	Diet enteral enfamil	-	PL (0)	-	--
22.	488 25	MB-1414/04	Dieta enteral NAN 1	-	PL (0)	-	--
23.	489 25	MB-1415/04	Dieta enteral Enfamil	-	PL (0)	-	--
24.	490 25	MB-1416/04	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
25.	537 25	MB-2050/04	Dieta enteral NAN 1	-	PL (0)	-	--
26.	538 25	MB-2051/04	Dieta enteral Enfamil	-	PL (0)	-	--
27.	539 25	MB-2052/04	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--
28.	557 25	MB-2458/04	Dieta enteral NAN 1	-	PL (0)	-	--
29.	558 25	MB-2459/04	Dieta enteral Enfamil	-	PL (0)	-	--
30.	559 25	MB-2460/04	Dieta enteral Iso source	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 12: Amostras de carne e produtos cárneos

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	326	5 Lara 01	Salsicha	-	BQ (6/12/12)	-	--
2.	327	5 Lara 02	Peito frango resfriado	-	BQ (2/4/1)	-	--
3.	328	5 Lara 03	Lingüiça de frango	-	PL (0)	-	--
4.	329	5 Lara 04	Lingüiça frango	-	BQ (2/4/2)	-	--
5.	330	5 Lara 05	Lingüiça frango	-	BQ (4/8/4)	-	--
6.	474	5 Pernil46	Pernil	-	PL (0)	-	--
7.	475	5 Pernil25	Pernil	-	PL (0)	-	--
8.	476	5 Pernil18	Pernil	-	PL (0)	-	--
9.	477	5 Pernil09	Pernil	-	PL (0)	-	--
10.	478	5 Pernil13	Pernil	-	PL (0)	-	--
11.	479	5 Pernil33	Pernil	-	PL (0)	-	--
12.	511	5 Lara 06	Frango resfriado	-	PL (0)	-	--
13.	519	5 Lara 07	Peito frango resfriado	-	PL (0)	-	--
14.	570	5 MB-3201/04	Base de carne	-	PL (0)	-	--
15.	571	5 MB-3202/04	Base de carne	+	API 20E	+++	++
16.	572	5 MB-3203/04	Base de carne	-	PL (0)	-	--
17.	677	5 MB-3793/04	Fígado suíno em pó	-	PL (0)	-	--
18.	678	5 MB-3794/04	Fígado suíno em pó	-	PL (0)	-	--
19.		MB-9D/04	Pernil	-	PL (0)	-	--
20.		MB-9E/04	Pernil	-	PL (0)	-	--
21.		MB-11D/04	Pernil	-	PL (0)	-	--
22.		MB-11E/04	Pernil	-	PL (0)	-	--
23.		MB-47D/04	Pernil	-	PL (0)	-	--
24.		MB-47E/04	Pernil	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 13: Amostras de pescados e produtos de pesca

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	266	7 MB-9438/03	Pescado - Peixe dourado	-	TSI (6/12/12)	-	--
2.	426	7 MB-0761/04	Pescados - Filé congelado de arraia	-	SR (3/6/6)	-	--
3.	440	7 MB-0861/04	Cação em postas e filé	-	SR (6/12/12)	-	--
4.	576	7 MB-PF01/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
5.	577	7 MB-PF02/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
6.	578	7 MB-PF03/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
7.	579	7 MB-PF04/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
8.	580	7 MB-PF05/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
9.	581	7 MB-PF06/04	Peixe fresco	-	TSI (2/4/4)	-	--
10.	582	7 MB-PF07/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
11.	583	7 MB-PF08/04	Peixe fresco	-	TSI (2/4/4)	-	--
12.	584	7 MB-PF09/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
13.	585	7 MB-PF10/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
14.	586	7 MB-PF11/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
15.	587	7 MB-PF12/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
16.	588	7 MB-PF13/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
17.	589	7 MB-PF14/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
18.	590	7 MB-PF15/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
19.	591	7 MB-PF16/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
20.	592	7 MB-PF17/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
21.	593	7 MB-PF18/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
22.	594	7 MB-PF19/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
23.	595	7 MB-PF20/04	Peixe fresco	-	PL (0)	+	- +
24.	596	7 MB-PF21/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
25.	597	7 MB-PF22/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
26.	598	7 MB-PF23/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
27.	599	7 MB-PF24/04	Peixe fresco	-	PL (0)	-	--
28.	684	7 MB-3722/04	Pescado seco, salgado e defumado	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 14: Amostras de ovos e derivados

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	2 6	MB-4876/03	Ovo integral em pó	-	SR (2/2/2)*	-	--
2.	3 6	MB-4877/03	Ovo integral em pó	-	SR (2/2/2)*	-	--
3.	4 6	MB-4878/03	Ovo líquido integral não pasteurizado	-	SR (6/6/4)*	-	--
4.	5 6	MB-4879/03	Ovo líquido integral pasteurizado.	-	API	-	--
5.	16 6	MB-5235/03	Ovo integral em pó	-	PL (0)	-	--
6.	17 6	MB-5236/03	Ovo integral em pó	-	PL (0)	-	--
7.	49 6	MB-5709/03	Ovo integral pasteurizado c/ sal	-	PL (0)	+	- +
8.	50 6	MB-5710/03	Ovo integral pasteurizado c/ sal	-	PL (0)	-	--
9.	51 6	MB-5711/03	Ovo integral pasteurizado c/ sal	-	SR	-	--
10.	54 6	MB-5935/03	Ovo integral pasteurizado c/ sal	-	SR	-	--
11.	72 6	MB-6609/03	Ovos "in natura"	-	BQ (4/4/2)*	-	--
12.	106 6	MB-8041/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
13.	107 6	MB-8042/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
14.	108 6	MB-8043/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
15.	109 6	MB-8044/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
16.	110 6	MB-8047/03	Ovo líquido pasteurizado	-	TSI (4/8/8)	-	--
17.	111 6	MB-8050/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
18.	112 6	MB-8051/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
19.	113 6	MB-8052/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	BQ (6/12/12)	-	--
20.		MB-8054/03	Ovo líquido pasteurizado	-	TSI (4/8/8)	-	--
21.	114 6	MB-8055/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
22.	129 6	MB-8158/03	Ovo integral pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
23.	130 6	MB-8159/03	Ovo integral pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
24.	131 6	MB-8160/03	Ovo integral pasteurizado com sal	-	TSI (2/4/4)	-	--
25.	132 6	MB-8161/03	Ovo integral pasteurizado com sal	-	TSI (2/4/4)	-	--
26.	134 6	MB-8200/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	TSI (6/12/12)	-	--
27.	135 6	MB-8203/03	Ovo líquido pasteurizado resfriado	-	TSI (6/12/12)	-	--
28.	136 6	MB-8204/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
29.	137 6	MB-8205/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
30.	141 6	MB-8274/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	TSI (4/6/6)	-	--
31.	142 6	MB-8275/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	SR (5/10/3)	-	--
32.	145 6	MB-8360/03	Ovo líquido pasteuriz c/sal	-	PL (0)	-	--
33.	146 6	MB-8361/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	PL (0)	-	--
34.	147 6	MB-8362/03	Ovo líquido pasteurizado com sal	-	BQ (2/4/1)	-	--
35.	148 6	MB-8363/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
36.	149 6	MB-8364/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
37.	150 6	MB-8365/03	Ovo líquido pasteurizado	-	TSI (4/7/7)	-	--
38.	155 6	MB-8448/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	BQ (4/8/3)	-	--
39.	156 6	MB-8449/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
40.	157 6	MB-8450/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	BQ (2/4/3)	-	--
41.	158 6	MB-8451/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	BQ (4/8/4)	-	--

Anexo 14. Continuação

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REFx BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
42.	158	6 MB-8475/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
43.	159	6 MB-8476/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (2/4/3)	-	--
44.	160	6 MB-8477/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (4/8/3)	-	--
45.	2	6 MB-4876/03	Ovo integral em pó	-	SR (2/2/2)*	-	--
46.	161	6 MB-8478/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (4/8/2)	-	--
47.	162	6 MB-8479/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (4/8/2)	-	--
48.	163	6 MB-8480/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	TSI (2/4/4)	-	--
49.	165	6 MB-8517/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (4/8/6)	-	--
50.	166	6 MB-8519/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
51.	171	6 MB-8580/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	SR (4/8/4)	-	--
52.	172	6 MB-8581/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
53.	173	6 MB-8582/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
54.	174	6 MB-8583/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
55.	176	6 MB-8662/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
56.	177	6 MB-8663/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
57.	178	6 MB-8664/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
58.	180	6 MB-8685/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
59.	203	6 MB-8814/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
60.	204	6 MB-8815/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
61.	205	6 MB-8816/03	Ovo líquido integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
62.	221	6 MB-9000/03	Ovo – Gema de ovo pasteurizada	-	PL (0)	-	--
63.	222	6 MB-9001/03	Ovo – Gema de ovo pasteurizada	-	PL (0)	-	--
64.	223	6 MB-9002/03	Ovo líquido pasteurizado	-	PL (0)	-	--
65.	264	6 MB-9425/03	Ovo integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
66.	265	6 MB-9426/03	Ovo integral pasteurizado	-	PL (0)	-	--
67.	272	6 MB-9464/03	Ovos in natura	-	PL (0)	-	--
68.	411	6 MB-0656/04	Ovo integral desidratado	-	SR (3/6/6)	-	--
69.	459	6 MB-1065/04	Ovos “in natura”	-	PL (0)	-	--
70.	544	6 MB-2126/04	Ovos “in natura”	-	PL (0)	-	--
71.	683	6 MB-3721/04	Ovos in natura	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 15: Amostras de leite

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	18 8	MB-5241/03	Leite condensado	-	PL (0)	-	--
2.	98 8	MB-7997/03	Leite	-	BQ	-	--
3.	99 8	MB-7998/03	Leite	-	BQ	-	--
4.	100 8	MB-7999/03	Leite	-	BQ	-	--
5.	181 8	MB-8690/03	Leite condensado	-	PL (0)	-	--
6.	227 8	MB-9025/03	Leite em pó com café	-	PL (0)	-	--
7.	345 8	MB-0197/04	Leite em pó integral	-	PL (0)	-	--
8.	346 8	MB-0198/04	Leite em pó integral	-	PL (0)	-	--
9.	545 8	MB-2127/04	Leite pasteurizado tipo C	-	PL (0)	-	--
10.	617 8	MB-PL01/04	Leite pasteurizado tipo C	-	PL (0)	-	--
11.	618 8	MB-PL02/04	Leite pasteurizado tipo B	-	PL (0)	-	--
12.	625 8	MB-PL12/04	Leite pasteurizado tipo B	-	PL (0)	-	--
13.	628 8	MB-PL18/04	Leite pasteurizado tipo C	-	TSI (2/4/4)	-	--
14.	636 8	MB-PL32/04	Leite pasteurizado integral	-	TSI (2/4/4)	-	--
15.	651 8	MB-PL51/04	Leite pasteurizado	-	TSI (2/4/4)	-	--
16.	654 8	MB-PL57/04	Leite pasteurizado tipo C	-	PL (0)	-	--
17.	671 ^a 8	MB-PL79/04	Leite Pasteurizado Tipo C	-	PL (0)	-	--
18.	686 ^a 8	MB-PL100/04	Leite tipo C	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = n° placas com colônias típicas/n° total de colônias isoladas/n° de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 16: Amostras de queijos

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	73	8 MB-6654/03	Queijo Minas padrão	-	SR (10/10/9)	-	--
2.	74	8 MB-6655/03	Queijo Minas frescal	-	SR (2/4/2)	-	--
3.	620	8 MB-PL04/04	Queijo frescal Jamava	-	SR (2/4/4)	-	--
4.	621	8 MB-PL05/04	Queijo frescal coqueiro	-	TSI (2/4/4)	-	--
5.	622	8 MB-PL09/04	Queijo minas frescal	-	PL (0)	-	--
6.	623	8 MB-PL10/04	Queijo tipo mussarela Nossa Toca	-	PL (0)	-	--
7.	624	8 MB-PL11/04	Queijo minas frescal	-	PL (0)	-	--
8.	635	8 MB-PL28/04	Queijo Minas frescal	-	TSI (2/4/4)	-	--
9.	637	8 MB-PL33/04	Queijo fresco	-	TSI (2/4/4)	-	--
10.	638	8 MB-PL34/04	Ricota – Puro Leite	-	TSI (2/4/4)	-	--
11.	639	8 MB-PL35/04	Queijo mussarela	-	TSI (2/4/4)	-	--
12.	641	8 MB-PL39/04	Queijo provolone	-	PL (0)	-	--
13.	642	8 MB-PL40/04	Queijo Minas padrão	-	PL (0)	-	--
14.	643	8 MB-PL41/04	Queijo mussarela	-	PL (0)	-	--
15.	644	8 MB-PL42/04	Queijo Minas Frescal	-	PL (0)	-	--
16.	645	8 MB-PL43/04	Queijo cremoso	-	PL (0)	-	--
17.	646	8 MB-PL44/04	Queijo Minas padrão	-	PL (0)	-	--
18.	648	8 MB-PL48/04	Queijo mussarela Búfala	-	TSI (2/4/4)	-	--
19.	650	8 MB-PL50/04	Queijo Minas Frescal	-	TSI (2/4/4)	-	--
20.	657	8 MB-PL60/04	Queijo Minas Frescal	-	PL (0)	-	--
21.	659	8 MB-PL65/04	Queijo mussarela Búfala	-	PL (0)	-	--
22.	661	8 MB-PL67/04	Requeijão cremoso	-	PL (0)	-	--
23.	662	8 MB-PL68/04	Ricota Fresca	-	TSI (2/4/4)	-	--
24.	663	8 MB-PL69/04	Queijo mussarela Búfala	-	TSI (2/4/4)	-	--
25.	664	8 MB-PL70/04	Queijo Tipo Mussarela	-	TSI (2/4/4)	-	--
26.	667	8 MB-PL76/04	Requeijão do Norte	-	PL (0)	-	--
27.	668	8 MB-PL77/04	Queijo tipo provolone	-	PL (0)	-	--
28.	669	8 MB-PL78/04	Queijo de coalho	-	PL (0)	-	--
29.	672 ^a	8 MB-PL80/04	Queijo Minas Frescal	-	TSI (1/2/2)	-	--
30.	674 ^a	8 MB-PL82/04	Ricota Frescal	-	PL (0)	-	--
31.	675 ^a	8 MB-PL83/04	Queijo Minas Frescal	-	TSI (2/4/4)	-	--
32.	676 ^a	8 MB-PL84/04	Queijo Tipo Mussarela	-	PL (0)	-	--
33.	677 ^a	8 MB-PL89/04	Queijo Minas Light	-	TSI (2/4/4)	-	--
34.	678 ^a	8 MB-PL90/04	Ricota Fresca	-	TSI (2/4/4)	-	--
35.	679 ^a	8 MB-PL91/04	Queijo tipo Mussarela	-	PL (0)	-	--
36.	680 ^a	8 MB-PL92/04	Queijo tipo Mussarela	-	PL (0)	-	--
37.	681 ^a	8 MB-PL95/04	Queijo minas frescal	-	TSI (2/4/4)	-	--
38.	682 ^a	8 MB-PL96/04	Queijo minas frescal	-	TSI (2/4/4)	-	--
39.	683 ^a	8 MB-PL97/04	Queijo parmesão	-	TSI (2/4/4)	f+	- +
40.	687 ^a	8 MB-PL104/04	Queijo Minas Frescal	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = n° placas com colônias típicas/n° total de colônias isoladas/n° de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 17: Amostras de outros produtos de laticínio

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	MB-5241/03		Leite condensado	-	PL (0)	-	--
2.	520 8	MB-1779/04	Danoninho	-	PL (0)	-	--
3.	619 8	MB-PL03/04	iogurte sabor morango	-	PL (0)	-	--
4.	626 8	MB-PL13/04	iogurte sabor morango	-	PL (0)	-	--
5.	627 8	MB-PL14/04	Manteiga	-	PL (0)	-	--
6.	629 8	MB-PL19/04	iogurte sabor morango	-	TSI (2/4/4)	-	--
7.	630 8	MB-PL20/04	iogurte sabor morango	-	TSI (2/4/4)	-	--
8.	631 8	MB-PL24/04	iogurte com polpa de fruta	-	TSI (2/4/4)	-	--
9.	632 8	MB-PL25/04	iogurte abacaxi	-	TSI (2/4/4)	-	--
10.	633 8	MB-PL26/04	iogurte morango	-	TSI (2/4/4)	-	--
11.	634 8	MB-PL27/04	iogurte coco	-	TSI (2/4/4)	-	--
12.	640 8	MB-PL36/04	Coalhada cremosa	-	TSI (2/4/4)	-	--
13.	649 8	MB-PL49/04	iogurte morango	-	TSI (2/4/4)	-	--
14.	652 8	MB-PL52/04	Doce de leite	-	TSI (2/4/4)	-	--
15.	655 8	MB-PL58/04	iogurte com fruta	-	PL (0)	-	--
16.	656 8	MB-PL59/04	iogurte sabor morango	-	PL (0)	-	--
17.	660 8	MB-PL66/04	Bebida Láctea de Coco	-	PL (0)	-	--
18.	665 8	MB-PL74/04	Bebida Láctea Morango	-	PL (0)	-	--
19.	666 8	MB-PL75/04	Bebida Láctea Pêssego	-	PL (0)	-	--
20.	673 ^a 8	MB-PL81/04	iogurte Morango	-	PL (0)	-	--
21.	684 ^a 8	MB-PL98/04	iogurte polpa de morango	-	PL (0)	-	--
22.	685 ^a 8	MB-PL99/04	Bebida lactea morango	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 18: Amostras de bolos, biscoitos, pães e similares

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX	
			Resultado	Etapa finalização	Resultado		
1.	6 10	MB-4883/03	Biscoito	-	PL (0)	-	--
2.	8 10	MB-4897/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
3.	9 10	MB-4898/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
4.	10 10	MB-4899/03	Bolo	-	PL (0)	-	--
5.	11 10	MB-4900/03	Bolo	-	PL (0)	-	--
6.	89 10	MB-7857/03	Pão integral	-	PL (0)	-	--
7.	115 10	MB-8057/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
8.	116 10	MB-8058/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
9.	117 10	MB-8059/03	Bolo chocolate	-	PL (0)	-	--
10.	118 10	MB-8060/03	Bolo chocolate	-	PL (0)	-	--
11.	119 10	MB-8061/03	Bolo baunilha	-	PL (0)	-	--
12.	120 10	MB-8062/03	Bolo baunilha	-	PL (0)	-	--
13.	196 10	MB-8779/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
14.	197 10	MB-8780/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
15.	198 10	MB-8781/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
16.	199 10	MB-8782/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
17.	200 10	MB-8783/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
18.	201 10	MB-8784/03	Panetone	-	PL (0)	-	--
19.	202 10	MB-8785/03	Panetone	-	SR (1/2/2)	-	--
20.	209 10	MB-8838/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
21.	210 10	MB-8839/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
22.	211 10	MB-8840/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
23.	250 10	MB-9308/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
24.	251 10	MB-9309/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
25.	252 10	MB-9310/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
26.	259 10	MB-9398/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
27.	260 10	MB-9399/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
28.	261 10	MB-9400/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
29.	262 10	MB-9406/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
30.	305 10	MB-9853/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
31.	306 10	MB-9854/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
32.	307 10	MB-9855/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
33.	308 10	MB-9856/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
34.	309 10	MB-9857/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
35.	310 10	MB-9858/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
36.	311 10	MB-9859/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--
37.	312 10	MB-9860/03	Alfajor	-	PL (0)	-	--

Anexo 18. Continuação

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REFx BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
38.	334	10 MB-0084/04	Alfajor	-	PL (0)	-	--
39.	335	10 MB-0085/04	Alfajor	-	PL (0)	-	--
40.	336	10 MB-0086/04	Alfajor	-	PL (0)	-	--
41.	337	10 MB-0087/04	Alfajor	-	PL (0)	-	--
42.	420	10 MB-0697/04	Bolo de chocolate	-	PL (0)	-	--
43.		MB-0698/04	Bolo de chocolate	-	PL (0)	-	--
44.	446	10 MB-0961/04	Bolo de chocolate	-	PL (0)	-	--
45.	480	10 MB-1376/04	Torrada	-	PL (0)	-	--
46.	481	10 MB-1377/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
47.	482	10 MB-1378/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
48.	483	10 MB-1379/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
49.	485	10 MB-1381/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
50.	486	10 MB-1399/04	Bolo baunilha	-	PL (0)	-	--
51.	487	10 MB-1400/04	Bolo baunilha	-	PL (0)	-	--
52.	513	10 MB-1592/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
53.	530	10 MB-2086/04	Bolo chocolate	-	PL (0)	-	--
54.	542	10 MB-2086/04	Bolo chocolate	-	PL (0)	-	--
55.	546	10 MB-2128/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
56.	547	10 MB-2129/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
57.	548	10 MB-2130/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
58.	552	10 MB-2395/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
59.	564	10 MB-2917/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
60.	565	10 MB-2918/04	Biscoito	-	PL (0)	-	--
61.	673	10 MB-3758/04	Bolo leite condensado	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 19: Amostras de amido, fubá, farinhas e massas

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
			Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	38 10 MB-5340/03	Fubá mimoso	-	TSI	+	- +
2.	179 10 MB-8672/03	Massa pizza	-	PL (0)	-	--
3.	286 10 MB-9765/03	Nhoque de batata pré cozida	-	PL (0)	-	--
4.	287 10 MB-9766/03	Talharim fresco	-	PL (0)	-	--
5.	403 10 MB-0519/04	Fubá mimoso	-	TSI (2/4/4)	-	--
6.	436 10 MB-0856/04	Massa de semola	-	PL (0)	-	--
7.	437 10 MB-0857/04	Massa de semola	-	PL (0)	-	--
8.	438 10 MB-0858/04	Massa de semola	-	PL (0)	-	--
9.	439 10 MB-0859/04	Massa de semola	-	PL (0)	-	--
10.	448 10 MB-1050/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
11.	449 10 MB-1051/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
12.	450 10 MB-1052/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
13.	451 10 MB-1053/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
14.	452 10 MB-1054/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
15.	453 10 MB-1055/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
16.	454 10 MB-1056/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
17.	455 10 MB-1057/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
18.	456 10 MB-1058/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
19.	457 10 MB-1059/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
20.	458 10 MB-1060/04	Amido milho	-	PL (0)	-	--
21.	463 10 MB-1164/04	Fubá mimoso	-	SR (2/4/4)	-	--
22.	529 10 MB-1981/04	Macarrão semola	-	PL (0)	-	--
23.	567 10 MB-3044/04	Massa lasanha	-	PL (0)	-	--
24.	675 10 MB-3777/04	Farinha trigo	-	PL (0)	-	--
25.	676 10 MB-3778/04	Farinha trigo	-	PL (0)	-	--
26.	679 10 MB-3831/04	Ravioli	-	PL (0)	-	--
27.	680 10 MB-3832/04	Capeletti	-	PL (0)	-	--
28.	681 10 MB-4226/04	Nhoque	-	PL (0)	+	- +

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 20: Amostras de grãos, sementes e farelos

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	14	10 MB-4964/03	Farelo de soja	-	TSI	-	--
2.	20	10 MB-5291/03	Cereal milho	+	API	+	++
3.	21	10 MB-5305/03	Farelo de soja	-	API (3/3/1)*	-	--
4.	22	10 MB-5306/03	Farelo de soja	-	API (2/2/1)*	-	--
5.	23	10 MB-5311/03	Farelo floculado	-	BQ (2/2/1)*	-	--
6.	24	10 MB-5313/03	Farelo floculado	+	API	+	++
7.	25	10 MB-5314/03	Farelo floculado	-	TSI	-	--
8.	39	10 MB-5402/03	Pipoca	-	SR	+	-+
9.	41	10 MB-5552/03	Soja	-	PL (0)	-	--
10.	42	10 MB-5553/03	Casca de soja	+	API	+	++
11.	55	10 MB-6091/03	Farelo floculado	-	PL (0)	-	--
12.	56	10 MB-6092/03	Soja	-	PL (0)	-	--
13.	59	10 MB-6197/03	Gergelim descascado	-	PL (0)	-	--
14.	64	10 MB-6369/03	Soja	-	PL (0)	-	--
15.	65	10 MB-6370/03	Farelo de soja	-	PL (0)	-	--
16.	77	10 MB-6676/03	Casca de soja	-	SR (2/4/4)	-	--
17.	78	10 MB-6677/03	Casca de soja	-	SR (2/4/4)	-	--
18.	79	10 MB-6678/03	Casca de soja	-	BQ (2/4/1)	-	--
19.	86	10 MB-6793/03	Farelo floculado	-	PL (0)	-	--
20.	105	10 MB-8026/03	Gergelin natural	-	BQ (4/8/4)	-	--
21.	123	10 MB-8110/03	Gergelin natural	-	BQ (2/4/4)	-	--
22.	133	10 MB-8169/03	Gergelim	-	SR	-	--
23.	151	10 MB-8385/03	Farelo floculado de soja	-	BQ (1/2/2)	-	--
24.	152	10 MB-8386/03	Soja	-	BQ (4/7/1)	-	--
25.	153	10 MB-8401/03	Gergelim tostado	-	PL (0)	-	--
26.	170	10 MB-8570/03	Gergelim tostado	-	PL (0)	-	--
27.	182	10 MB-8699/03	Gergelim	-	PL (0)	-	--
28.	229	10 MB-9100/03	Gergelim	-	PL (0)	-	--
29.	255	10 MB-9357/03	Gergelim natural	-	PL (0)	-	--
30.	256	10 MB-9358/03	Gergelim natural	-	PL (0)	-	--
31.	441	10 MB-0945/04	Farelo de soja	-	PL (0)	-	--
32.	442	10 MB-0946/04	Farelo de soja	-	PL (0)	-	--
33.	443	10 MB-0947/04	Farelo de soja	-	PL (0)	-	--
34.	444	10 MB-0948/04	Farelo de soja	-	SR (3/6/6)	-	--
35.	445	10 MB-0949/04	Farelo de soja	-	SR (2/4/4)	-	--
36.	505	10 MB-1542/04	Cevada	-	PL (0)	-	--
37.	506	10 MB-1543/04	Cevada	-	PL (0)	-	--
38.	507	10 MB-1544/04	Cevada	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = n° placas com colônias típicas/n° total de colônias isoladas/n° de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 21: Amostras de ração animal e ingredientes para formulação de ração

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
1.	7	30 MB-4896/03	Farinha de carne	+	API (4/4/1)*	+++	++
2.	57	30 MB-6121/03	Farinha de carne	+	API (4/4/1)*	++	++
3.	58	30 MB-6122/03	Farinha de carne	+	API 20 E	+	++
4.	63	30 MB-6349/03	Farinha carne SLA 353	+	API (6/6/5)*	++	++
5.	70	30 MB-6589/03	Farinha de carne SLA 367	-	BQ (6/6/2)*	-	--
6.	71R	30 MB-6592/03	Farinha de vísceras SLA 368	-	PL (0)	-	--
7.	144	30 MB-8308/03	Farinha de carne	-	PL (0)	-	--
8.	161	30 MB-8473/03	Farinha de vísceras F2	+	BQ (6/12/12)	+	++
9.	213	30 MB-8847/03	Farinha de carne	+	BQ (3/6/6)	+	++
10.	225	30 MB-9015/03	Farinha de pena	-	PL (0)	-	--
11.	226	30 MB-9017/03	Farinha de vísceras	-	PL (0)	-	--
12.	263	30 MB-9409/03	Farinha de carne	+	BQ	+	++
13.	278	30 MB-9581/03	Farinha de pena	-	PL (0)	-	--
14.	279	30 MB-9582/03	Farinha de vísceras	-	PL (0)	-	--
15.	288	30 MB-9768/03	Ração animal	-	PL (0)	-	--
16.	289	30 MB-9769/03	Ração animal	-	PL (0)	-	--
17.	290	30 MB-9807/03	Farinha p/ ração	-	PL (0)	-	--
18.	291	30 MB-9808/03	Farinha p/ ração	-	PL (0)	-	--
19.	325	30 MB-9919/03	Farinha de carne	-	PL (0)	-	--
20.	348	30 MB-0234/04	Ração animal	-	TSI (2/4/4)	-	--
21.	349	30 MB-0235/04	Ração animal	-	SR (4/8/5)	-	--
22.	350	30 MB-0236/04	Ração animal	-	SR (4/8/7)	-	--
23.	351	30 MB-0237/04	Ração animal	-	SR (6/12/8)	-	--
24.	352	30 MB-0238/04	Ração animal	-	SR (4/8/2)	-	--
25.	353	30 MB-0239/04	Ração animal	-	SR (4/8/4)	-	--
26.	412	30 MB-0670/04	Farinha de penas	-	PL (0)	-	--
27.	413	30 MB-0671/04	Farinha de penas	-	PL (0)	-	--
28.	414	30 MB-0672/04	Farinha de vísceras	-	PL (0)	-	--
29.	415	30 MB-0673/04	Farinha de vísceras	+	API 20 E	+++	++
30.	416	30 MB-0674/04	Farinha de vísceras	+	API 20 E	+++	++
31.	422	30 MB-0702/04	Ração animal	-	PL (0)	-	--
32.	423	30 MB-0703/04	Ração animal	-	PL (0)	-	--
33.	424	30 MB-0704/04	Ração animal	-	PL (0)	-	--
34.	425	30 MB-0725/04	Ração animal	-	PL (0)	-	--
35.	508	30 MB-1570/04	Ração seca	-	PL (0)	-	--
36.	509	30 MB-1588/04	Ração seca	-	PL (0)	-	--
37.	510	30 MB-1589/04	Ração seca	-	PL (0)	-	--

Anexo 21: Continuação

Nº	Código da amostra		Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização	Resultado	
38.	515	30 MB-1747/04	Ração animal	+	API 20 E	+	++
39.	516	30 MB-1748/04	Ração animal	-	SR (3/6/2)	-	-
40.	517	30 MB-1749/04	Ração animal	-	BQ (4/8/3)	-	--
41.	518	30 MB-1750/04	Ração animal	+	API 20 E	+	++
42.	533	30 MB-2039/04	Ração	-	PL (0)	-	--
43.	534	30 MB-2040/04	Ração	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

* Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 22: Amostras de outros alimentos diversos

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Código da amostra	Identificação da amostra	Método Referência		Sistema Bax	REF X BAX	
			Resultado	Etapa finalização	Resultado		
1.	12 29	MB-4907/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ	-	--
2.	13 29	MB-4908/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ	-	--
3.	19 29	MB-5259/03	Mel	-	PL (0)	f+	- +
4.	44 R 29	MB-5560/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ (3/3/2)*	-	--
5.	45 29	MB-5561/03	Conteúdo intestinal de aves	-	TSI (2/2/2)*	-	--
6.	46 29	MB-5562/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ (3/3/1)*	-	--
7.	47 29	MB-5597/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ (6/6/3)*	-	--
8.	48 29	MB-5598/03	Conteúdo intestinal de aves	-	BQ (6/6/4)*	-	--
9.	66R 29	MB-6414/03	Levedura seca	-	PL (0)	+	- +
10.	67 29	MB-6415/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
11.	68 29	MB-6469/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
12.	75 29	MB-6674/03	Pectina cítrica	-	PL (0)	-	--
13.	76 29	MB-6675/03	Pectina cítrica	-	PL (0)	-	--
14.	82R 29	MB-6686/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
15.	83 29	MB-6687/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
16.	84 29	MB-6688/03	Levedura seca	-	SR (2/4/4)	-	--
17.	85 29	MB-6689/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
18.	101 29	MB-8012/03	Levedura natural	-	PL (0)	-	--
19.	122 29	MB-8072/03	Levedura seca	-	PL (0)	++	- +
20.	143 29	MB-8303/03	Levedura seca	-	SR	-	--
21.	164 29	MB-8503/03	Sal refinado	-	PL (0)	-	--
22.	191 29	MB-8724/03	Levedura seca	-	SR (4/4/3)*	-	--
23.	212 29	MB-8845/03	Levedura seca tipo 1	-	PL (0)	-	--
24.	217 29	MB-8881/03	Carregeana	-	PL (0)	-	--
25.	219 29	MB-8991/03	Levedura autolisada	-	PL (0)	-	--
26.	220 29	MB-8992/03	Parede celular de levedura	-	PL (0)	-	--
27.	257 29	MB-9386/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
28.	258 29	MB-9387/03	Levedura seca	-	PL (0)	-	--
29.	285 29	MB-9722/03	Bebida a base de soja	-	PL (0)	-	--
30.	354 8	MB-0271/04	Levedura – Fermento biológico fresco	-	SR (2/4/4)	-	--
31.	357 29	MB-0333/04	Cereal - Arroz	-	SR (4/8/7)	-	--
32.	405 29	MB-0563/04	Cereal - Feijão em grão carioca	-	TSI (2/4/4)	-	--
33.	418 29	MB-0694/04	Embalagem de polipropileno p/ café	-	SR (1/2/2)	-	--
34.	419 29	MB-0695/04	Embalagem de polipropileno p/ farinha	-	PL (0)	-	--
35.	427 29	MB-0763/04	Saco PEBD	-	PL (0)	-	--
36.	503 29	MB-1464/04	Sorvete de massa	-	PL (0)	-	--
37.	504 29	MB-1468/04	Sal refinado Norsal	-	PL (0)	-	--
38.	535 29	MB-2041/04	Creme de gordura	-	PL (0)	-	--
39.	536 29	MB-2042/04	Creme de gordura	-	PL (0)	-	--
40.	553 29	MB-2450/04	Embalagem laminada p/ barra cereal	-	PL (0)	-	--
41.	554 29	MB-2451/04	Embalagem de PET p/ cereais	-	PL (0)	-	--
42.	555 29	MB-2452/04	Embalagem p/ carne cozida	-	PL (0)	-	--
43.	681 29	MB-3790/04	Sorvete	-	PL (0)	-	--
44.	682 29	MB-3791/04	Sal	-	PL (0)	-	--

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo. * Isolou apenas 1 colônia/placa, o método de referência manda isolar pelo menos 2.

Anexo 23: Amostras de alimentos contaminados artificialmente

Resultados das análises de *Salmonella*: método de referência (BAM/FDA) x sistema BAX

Nº	Identificação da amostra	Cepa inoculada	Nível de inóculo	Método Referência		Resultado do Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização		
1.	logurte	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	-	PL (0)	-	--
2.	logurte	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	-	PL (0)	-	--
3.	logurte	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	-	PL (0)	-	--
4.	Bebida Láctea	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	-	PL (0)	-	--
5.	Bebida Láctea	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	-	PL (0)	-	--
6.	Bebida Láctea	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	-	PL (0)	+	- +
7.	Requeijão cremoso	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
8.	Requeijão cremoso	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
9.	Requeijão cremoso	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++
10.	Ricota Fresca	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
11.	Ricota Fresca	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
12.	Ricota Fresca	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	-	+ -
13.	Queijo Mussarela Búfala	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
14.	Queijo Mussarela Búfala	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
15.	Queijo Mussarela Búfala	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++
16.	Queijo Tipo Mussarela	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
17.	Queijo Tipo Mussarela	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
18.	Queijo Tipo Mussarela	<i>S.typhimurium</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++
19.	Bebida Láctea Morango	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Alto	-	PI (0)	+	- +
20.	Bebida Láctea Morango	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	médio	-	PL (0)	-	--
21.	Bebida Láctea Morango	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Baixo	-	PL (0)	-	--
22.	Bebida Láctea Pêssego	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Alto	-	PL (0)	-	--
23.	Bebida Láctea Pêssego	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	médio	-	PL (0)	-	--
24.	Bebida Láctea Pêssego	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Baixo	-	PL (0)	-	--
25.	Requeijão do Norte	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
26.	Requeijão do Norte	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++

Anexo 23: Continuação

Nº	Identificação da amostra	Cepa inoculada	Nível de inóculo	Método Referência		Resultado do Sistema Bax	REF X BAX
				Resultado	Etapa finalização		
27.	Requeijão do Norte	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++
28.	Queijo tipo provolone	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
29.	Queijo tipo provolone	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
30.	Queijo tipo provolone	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++
31.	Queijo de coalho	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Alto	+	BQ	+	++
32.	Queijo de coalho	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	médio	+	BQ	+	++
33.	Queijo de coalho	<i>S. mbandaka</i> FIOCRUZ	Baixo	+	BQ	+	++

Etapa finalização: PL = plaqueamento diferencial, TSI = características em TSI e LIA, SR = sorologia, BQ = provas bioquímicas (uréia, VM, VP, indol, citrato), API = Resultado API 20E. Entre parênteses = nº placas com colônias típicas/nº total de colônias isoladas/nº de colônias que chegaram àquela etapa.

Resultado Bax (pico da amostra): +++ = forte positivo, +++f = forte positivo fundido, ++ = moderado positivo, f+ = fraco positivo, - = negativo.

Anexo 24: Publicação Diário Oficial da União (D.O.U.) – oficialização do método BAX de detecção de *Salmonella* em alimentos.

Diário Oficial da União - Seção 1

Nº 113, terça-feira, 15 de junho de 2004

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 7 DE JUNHO DE 2004

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o inciso II, art. 15, do Anexo I do Decreto nº 4.629, de 21 de março de 2003, tendo em vista o disposto na Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, e o que consta do Processo nº 21000.002596/2004-94, resolve:

Art. 1º Oficializar a validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais - A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp em amostras de alimentos, água e amostras ambientais - swab como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme disposto no Anexo.

Art. 2º Subdelegar competência ao Diretor do Departamento de Defesa Animal, para baixar Normas complementares necessárias à validação de metodologias de referência utilizadas pelo Ministério, por proposta da Coordenação de Laboratório Animal.

Parágrafo único. A metodologia de que trata este artigo será atualizada, sempre que a inovação tecnológica assim recomendar, por meio de ato do Diretor do Departamento de Defesa Animal, no âmbito de sua competência.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MAÇAO TADANO

ANEXO

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA PELO SISTEMA DE DETECÇÃO PATOGENICA PARA ALIMENTOS E AMOSTRAS AMBIENTAIS - A-BAX® PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS, ÁGUA E AMOSTRAS AMBIENTAIS -SWAB, COMO MÉTODO ALTERNATIVO EQUIVALENTE AO MÉTODO DE REFERÊNCIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO - MAPA

O trabalho teve como objetivo a validação da metodologia utilizada pelo Sistema A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp, em comparação com a metodologia de referência utilizada pelo MAPA (Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água - Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003) envolvendo amostras de alimentos, água e amostras ambientais - swab.

O trabalho foi iniciado com uma avaliação do desempenho do Sistema A-BAX® em relação ao método de Referência (MAPA), no LANAL - Microbiologia, por meio da utilização de amostras homogêneas de 25g, preparadas com matriz à base de carne, fortificadas com baixa concentração do microrganismo alvo (próximo do limite de detecção do método de Referência) e alta concentração de interferentes. Foi concluído que o Sistema A-BAX® é comparável ao método de Referência por apresentar uma concordância estatística em nível de 95% de confiança baseado nos resultados do Chi square (χ^2); um grau de correspondência =95%; sensibilidade =98%; especificidade =95%; taxa de falso negativo = 2,5%; taxa de falso positivo =5%, por apresentar uma recuperação em frações igual a 92% em relação ao método de Referência.

Foram analisados 70 tipos de produtos simultaneamente em quatro laboratórios - LAPA/PE, LARA/SP, FOOD INTELLIGENCE/SP e SFDK/SP -, totalizando 1879 amostras da rotina dos laboratórios. Das amostras analisadas, 53 apresentaram resultados positivos e 1798 resultados negativos em ambos os métodos; 28 amostras apresentaram resultado positivo no Sistema A-BAX® e negativo no método de Referência, e uma amostra apresentou resultado positivo no método de Referência e negativo no Sistema A-BAX®. Estes dados indicam que o Sistema A-BAX® apresenta uma sensibilidade de 98,1%; uma especificidade de 98,5%; uma taxa de falso negativo igual a 1,9%; uma taxa de falso positivo igual a 1,5% e uma precisão relativa igual a 98,5%.

Por meio dos dados obtidos, concluiu-se que o Sistema A-BAX® é equivalente ao método de Referência para a detecção de *Salmonella* spp baseado nos resultados do Chi square (χ^2).

