

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BRUNA GOMES FRANQUEIRA YAMADA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOLOGIAS
CONVENCIONAIS E TÉCNICAS RÁPIDAS PARA
DETECÇÃO DE COLIFORMES E *SALMONELLA* SP
EM ALIMENTOS**

BAURU
2015

BRUNA GOMES FRANQUEIRA YAMADA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOLOGIAS
CONVENCIONAIS E TÉCNICAS RÁPIDAS PARA
DETECÇÃO DE COLIFORMES E *SALMONELLA* SP
EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU
2015

Y192c Yamada, Bruna Gomes Franqueira

Estudo comparativo entre metodologias convencionais e novas técnicas rápidas para detecção de Coliformes e *Salmonella* sp em alimentos / Bruna Gomes Franqueira Yamada. -- 2015.
62f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula C. Coutinho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Comparação. 2. Alimentos. 3. Metodologias. I. Coutinho, Ana Paula Cerino. II. Título.

BRUNA GOMES FRANQUEIRA YAMADA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOLOGIAS
CONVENCIONAIS E NOVAS TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE
COLIFORMES E *SALMONELLA* SP EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Banca Examinadora:

Profa. Dra Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 11 de dezembro de 2015.

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus que me deu forças para chegar até aqui e aos meus pais, Eliane e Marco, e ao meu padrasto Alam, que me ensinaram a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui, e estar concluindo mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais amados, Eliane e Marco, por sempre estarem comigo me ensinando as prioridades da vida, por sempre me ajudar quando a vida coloca seus obstáculos a minha frente.

Ao meu padrasto querido, pai de coração, Alam, por estar presente na minha vida, principalmente nesse momento tão importante, que sempre me apoiou e me ajudou quando mais precisei.

Ao meu querido João Guilherme, que esteve ao meu lado me apoiando a todo instante.

A minha orientadora Prof^a Dra. Ana Paula Cerino Coutinho, pela dedicação, orientação, apoio e ao longo desse tempo sendo muito compreensiva, atenciosa e prestativa nessa fase final.

E a minha banca, Prof^a Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato, que esta comigo desde o inicio da minha jornada me ensinando.

RESUMO

Os alimentos fazem parte da vida do ser humano tendo a função de fornecer nutrientes e energia para o organismo. Mas, os alimentos quando são manipulados, estocados e higienizados inadequadamente podem sofrer deterioração microbiana. Sendo assim, quando esses alimentos contaminados são ingeridos por humanos acabam causando doenças. Os principais micro-organismos patogênicos que podem ser encontrados em alimentos são a *Salmonella* spp e os Coliformes/*Escherichia coli*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar os métodos convencionais com os métodos rápidos nas análises microbiológicas de alimentos e, avaliar as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos. Vários autores detectaram o crescimento da *Salmonella* spp e dos Coliformes/*Escherichia coli* em alimentos foi feito uma análise microbiológica, atualmente existindo dois tipos de metodologias que podem ser empregadas para análise, metodologia convencional que consiste no método, em que o mais usado é o ISO 6975, para *Salmonella* e a técnica de tubos múltiplos para detecção de Coliformes, e a metodologia rápida que consiste nos métodos *Bax System* e TECRA *Salmonella* Unique para *Salmonella*, e *Petrifilm* e *Simplplate* para Coliformes, que são métodos que se diferem pelo custo, sensibilidade, execução e tempo de detecção. Os resultados que foram obtidos pelos métodos usados para *Salmonella*, foram satisfatórios, com sensibilidade semelhantes para detecção do micro-organismo, já os métodos usados para detecção de coliformes houve divergências nos resultados, tendo casos em que houve mais sensibilidade no método rápido do que no método convencional e mais sensibilidade no método convencional, do que no rápido.

Palavras-chave: Alimentos. Micro-organismos. Análise Microbiológica. Metodologias. Comparação.

ABSTRACT

The foods are part of the life of human beings having the function of providing nutrients and energy to the body. But when food is handled, stored and sanitized improperly may undergo microbial spoilage. So when these contaminated foods are ingested by humans end up causing diseases. The main pathogenic microorganisms that can be found in foods are Coliforms/ *Escherichia coli* and *Salmonella*. Thus, the aim of this study was to compare conventional methods with rapid methods for microbiological analysis of food and evaluate the advantages and disadvantages of different methods. Several authors have detected the growth of *Salmonella* and Coliforms / *Escherichia coli* in food microbiological analysis was done currently exist two types of methods that can be employed to analyze conventional methodology that is the method in which the most used is the ISO 6975, *Salmonella* and technical multiple tube for detection of coliforms and rapid methodology which consists of *Bax system* and TECRA *Salmonella* Unique for *Salmonella* and *Petrifilm* and *Simplate* to Coliforms, which are methods that differ by the cost, sensitivity, implementation and detection time. The results that were obtained by the methods used for *Salmonella*, were satisfactory, with similar sensitivity for the detection of micro-organism, and the methods used for coliform detection were no differences in the results with cases in which a greater sensitivity in rapid method than in It is agreed method and more sensitivity in the conventional method than rapid.

Keywords: Food. Micro-organisms. Microbiological analysis. Methodologies. Comparison.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parte 1 - Técnica para análise de Coliformes	26
Figura 2 - Parte 2 - Técnica para análise de Coliformes	27
Figura 3 - “Kits” analíticos oficializados pela AOAC para detecção da <i>Salmonella</i> ...	29
Figura 4 - “Kits” analíticos oficializados pela AOAC	31
Figura 5 - Ensaio do Bax System	32
Figura 6 - “Kit” TECRA <i>Salmonella</i> UNIQUE	33
Figura 7 - “Kits” analíticos oficializados pela AOAC para contagem de coliformes totais e/ ou <i>E.coli</i> em alimentos	35
Figura 8 - “Kits” analíticos oficializados pela AOAC	36
Figura 9 - <i>Simpla</i> te coliformes totais e <i>E.coli</i>	37
Figura 10 - “Kit” Petrifilm com a presença de <i>E.coli</i> e coliformes totais.....	38
Figura 11 - Quadro comparativo do tempo necessário para o desenvolvimento dos três métodos para detecção de <i>Salmonella</i> em alimentos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de atividade da água e teor de umidade do alimento.....	15
Tabela 2 - Classificação dos alimentos segundo suas faixas de pH.....	16
Tabela 3 - Orientação para o uso das Tabelas de NMP, em função da quantidade de amostra presente nas alíquotas e das diluições inoculadas, com limite de detecção da contagem e a regra para conversão do resultado.....	23
Tabela 4 - Meios de condições de incubação recomendado pela ISO, FDA e USDA nas diversas etapas de ensaio <i>Salmonella</i> em alimentos.	24
Tabela 5 - Contagens de <i>E.coli</i> pelos tubos múltiplos e Petrifilm EC mostrando os resultados divergentes e 19 amostras de linguiça, considerando o limite máximo para coliformes 45°C estabelecido pela legislação brasileira. ..	43
Tabela 6 - Resultados das análises de linguiça com contagens de <i>E.coli</i> somente pelo método Petrifilm EC, considerando o limite máximo para <i>E.coli</i> equivalente a coliformes 45°C.....	44
Tabela 7 - Contagem de coliformes totais em alimentos.....	46
Tabela 8 - Coliformes termotolerante/ <i>Escherichia coli</i> em alimentos.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	ALIMENTOS E SEUS FATORES INTRINSECOS E EXTRINSECOS	14
3.1.1	Fatores Intrínsecos	14
3.1.2	Fatores Extrínsecos	17
3.2	CONTROLE DE PATOGÊNOS EM ALIMENTOS	17
3.2.1	Coliformes	18
3.2.1.1	<i>Coliformes Totais</i>	18
3.2.1.2	<i>Coliformes Termotolerantes</i>	18
3.2.1.3	<i>Escherichia coli</i>	18
3.2.2	Salmonella sp	20
3.3	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM ALIMENTOS	21
3.3.1	Métodos convencionais para Coliformes	22
3.3.1.1	<i>Método tradicional para detecção de Salmonella sp</i>	23
3.3.1.2	<i>Método de detecção de Coliformes</i>	25
3.3.2	Métodos Rápidos	28
3.3.2.1	<i>Salmonella</i>	28
3.3.2.2	<i>Coliformes</i>	34
3.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS TRADICIONAIS E RÁPIDOS	38
3.4.1	Salmonella	38
3.4.1.1	<i>Comparação entre método Bax System e método convencional ISO 6579:2002</i>	38
3.4.1.2	<i>Comparação entre o método TECRA Salmonella UNIQUE e o método convencional</i>	39
3.4.2	Coliformes	42
3.4.2.1	<i>Petrifilm</i>	42
3.4.2.2	<i>Simplite</i>	45
4	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A - TABELA NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)	53

ANEXO B – ESQUEMAS DE ANALISES PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP..... 56

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos são produtos que podem sofrer contaminação microbiana pela falta de limpeza adequada, manipulação inadequada ou má conservação. Os micro-organismos que contaminam os alimentos causam a deterioração e também patologias aos seres humanos. As doenças microbianas de origem alimentar são causadas por micro-organismos patogênicos que estão presentes nos alimentos. Geralmente, após a ingestão de alimentos contaminados há a ocorrência de distúrbios gastrointestinais, sendo que estes muitas vezes são causados por *Salmonella* sp e Coliformes. É importante que seja monitorado a presença desses micro-organismos para que não ocorra essas doenças, através de análises microbiológicas. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os coliformes são bioindicadores das condições higiênicas do alimento, pois se há a presença desses micro-organismos o alimento foi mal manipulado ou teve uma higiene inadequada, tornando-se inadequado para consumo. Portanto, pode ser feita análise microbiológica para a detecção de coliformes totais e termotolerantes, além de também verificar a presença da bactéria *Escherichia coli*, que é uma bactéria patogênica que está presente no trato gastrointestinal de qualquer animal de sangue quente e, quando ingerida causa doenças que resultam em distúrbios gastrointestinais. (SILVA, 2002).

A *Salmonella* sp é uma bactéria que quando está presente nos alimentos causam deterioração e patologias nos seres humanos quando ingerida. As doenças gastrointestinais provocadas pela presença de *Salmonella* podem ser severas, dependendo da espécie do micro-organismo.

A identificação destes micro-organismos pode ser feita por métodos convencionais e rápidos. Os coliformes são identificados por análise microbiológica convencional, através de tubos com meios de cultura, em que a leitura é feita pelo método NMP (Número Mais Provável), que é uma técnica quantitativa, em tubos múltiplos. Enquanto, a *Salmonella* sp é identificada através do método de presença ou ausência, que utilizam técnicas de enriquecimento, com água peptonada ou caldo lactosado, e posteriormente isolada em meios sólidos. A técnica convencional, apesar de ser mais utilizada, é bastante complexa e demorada, pelo o uso de

diferentes meios de cultura e levando dias para obtenção dos resultados.(PAULA, 2002; SILVA et al., 2010).

Existem outros métodos alternativos para análise, como os métodos rápidos, para detecção da *Salmonella* sp e Coliformes, dentro de uma vasto grupo, para a detecção da *Salmonella* sp tem o *Bax System* que consiste na técnica de PCR (Reação da Cadeia da Polimerase) e o TECRA *Salmonella Unique*, que é um imunoensaio composto por 6 tubos enumerados e um bastão com contem anticorpos específicos para essa bactéria, para detecção de Coliformes existem os *Simplite*, um substrato cromogênio e fluorgênico em placa, identificando coliformes totais e *E.coli*, e o *Petrifilm* que é uma análise em cartão revestido de enzimas desidratadas, coberto com filme plástico que o reveste. (KILLNER, 2008; PAULA, 2002; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006; SILVA et al., 2010).

A ANVISA liberou os métodos rápidos de análises microbiológicos por suas vantagens. Apesar dos métodos tradicionais serem simples e de baixo custo, ele se limita em resultados tardios. Assim, esses novos métodos visam melhorar a qualidade e obter resultados em pouco tempo. (SILVA, 2002).

2 OBJETIVOS

Apresenta-se nos tópicos abaixo o objetivo geral e os objetivos específicos do presente estudo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os métodos tradicionais com os métodos rápidos para análises microbiológicas de alimentos, para *Salmonella* sp e Coliformes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) descrever os fatores que influenciam a qualidade em alimentos;
- b) descrever os principais micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos;
- c) avaliar os métodos convencionais e rápidos para detecção de *Salmonella* sp e Coliformes em alimentos;
- d) descrever as vantagens e desvantagens dos métodos convencionais e rápidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica tem o intuito de conceituar alimentos, apresentar causas de deterioração de alimentos, os micro-organismos que se multiplicam nele, apresentar os métodos convencionais e rápidos para Coliformes de *Salmonella* sp e fazer uma comparação entres eles.

3.1 ALIMENTOS E SEUS FATORES INTRINSECOS E EXTRINSECOS

Os alimentos tem uma importante função na vida do ser humano, como fornecer nutrientes e energia necessária para o organismo. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Quimicamente o alimento é composto por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e pequenas quantidades de outros elementos. Também são ricos em nutrientes e água e, por isso são susceptíveis a deterioração microbiana. (FRANCO; LADGRAF, 2008; GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A principal deterioração dos alimentos é causada por micro-organismos. Estes tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com as características do próprio alimento, que são o pH, Atividade da Água (Aa), potencial de oxi-redução, composição química e interação entre os micro-organismos. Já os fatores extrínsecos relacionam o ambiente em que o micro-organismo está presente, sendo então influenciado pela temperatura ambiente, umidade e presença de gases. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009)

3.1.1 Fatores Intrínsecos

Os fatores intrínsecos estão relacionados com as características do próprio alimento, serão descritas a seguir.

A Atividade da água está relacionada com a quantidade de água presente no alimento, porém somente o seu teor não indica a sua deterioração, por isso surgiu esse conceito de Atividade da água (Aa), que relaciona a atividade metabólica e o crescimento do micro-organismo e suas reações hidrolíticas. Esse conceito indica a

intensidade da ligação da água com outros componentes não aquosos, que acabam provocando o crescimento do micro-organismo e, assim sofrendo diferentes reações. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009; ORNADEZ, 2005).

Esse fator é medido pela relação entre a pressão parcial de vapor contido no alimento (P) e a pressão parcial da água pura (Po), a uma mesma temperatura.

A atividade de água existente no alimento, geralmente para o crescimento microbiano é inferior a 1,00 (0,7 a 0,9). Então, a multiplicação microbiana é dependente da atividade de água; sendo que, cada espécie apresenta um valor característico. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009)

A Tabela 1 apresenta a relação da atividade da água com o teor de umidade contida em diferentes alimentos.

Tabela 1 - Relação de atividade da água e teor de umidade do alimento

Alimento	Teor de umidade (%)	Atividade da água
Gelo (0°C)	100	1,00 ^a
Carne fresca	70	0,985
Pão	40	0,96
Gelo (-10°C)	100	0,91 ^a
Geleia	35	0,86
Gelo (-20°C)	100	0,82 ^a
Farinha de trigo	14,5	0,72
Gelo (-50°C)	100	0,62 ^a
Passas	27	0,6
Massas	10	0,45
Cacau		0,4
Doces fervidos	3	0,3
Biscoitos	5	0,2
Leite desnatado	3,5	0,11
Chips de batata	1,5	0,08

Fonte: Alonso (2013).

Legenda: ^a Pressão de vapor do gelo dividido pela pressão de vapor da água.

Nota: Adaptado pela autora.

O pH mede a concentração de ions de H⁺ de um alimento ou solução. Cada alimento contém o seu valor de pH e, a maioria dos micro-organismos crescem em pH perto da neutralidade (6,6 – 7,5). (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A Tabela 2 mostra a classificação dos alimentos em relação ao pH dos mesmo e a microbiota presente.

Tabela 2 - Classificação dos alimentos segundo suas faixas de pH

Alimentos	Faixa de pH	Característica da Microbiota	Alimentos
Pouco ácidos	>4,5	Variada: Maioria das bactérias (incluindo as patogênicas), bolores e leveduras.	Leite, carne, pescados e vegetais em geral.
Ácidos	4,0 - 4,5	Restrita para algumas bactérias. Condições ótimas para bolores e leveduras.	Frutas e hortaliças.
Muito ácidos	<4,0	Bastante restrita: Bactérias lácticas e acéticas, bolores e leveduras.	Frutas cítricas, maçãs, conservas de azeitonas, sucos de frutas e refrigerantes.

Fonte: Gava, Silva e Frias (2009, p.94)

Para que não ocorra a deterioração dos alimentos, acidulantes são adicionados nos alimentos para a alteração do pH e conseqüentemente diminuir o crescimento microbiológico. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O potencial de oxi-redução está relacionado com a troca de elétrons entre compostos químicos. Quando um elemento perde elétrons, ele é chamado de oxidado, e quando ganha elétrons, reduzido. Quanto mais oxidado é um composto, mais positivo é o seu potencial de oxi-redução e, quanto mais reduzido, mais negativo é esse potencial. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A multiplicação dos micro-organismos é afetada pelo potencial de oxi-redução do meio em que se encontra, no qual cada tipo de micro-organismo exige a presença ou ausência de oxigênio. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Para que haja o crescimento microbiano, a composição química do alimento é muito importante. A presença de água, fonte de energia, nitrogênio, vitaminas e sais minerais são essenciais para o desenvolvimento microbiano. As bactérias usam como fonte de energia açúcares, álcoois e aminoácidos, sendo que alguns micro-organismos são capazes de utilizar açúcares mais complexos transformando-os em açúcares simples. As vitaminas tem papel fundamental, pois fazem parte de coenzimas que estão envolvidas em reações metabólicas. (FRANCO; LANDGRAF; 2008).

A interação entre os micro-organismos pode ocorrer pelo crescimento de apenas um micro-organismo, que cria condições no alimento para que outros micro-organismos cresçam. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

3.1.2 Fatores Extrínsecos

Os fatores extrínsecos estão relacionados ao ambiente que cerca o alimento, como a umidade, temperatura e presença de gases, que potencializam as contaminações iniciais ou servem de barreiras ao desenvolvimento microbiano. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A umidade relativa do ar influencia diretamente a Atividade da água (Aa), pois se o alimento com baixa Atividade da água for armazenado em um ambiente com umidade alta poderá aumentar a atividade da água e causar a deterioração do alimento. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A temperatura é um dos fatores mais importantes que afetam a multiplicação de micro-organismos. Eles podem se multiplicar numa faixa muito ampla de temperatura, e para classificar os micro-organismos pela temperatura ideal de multiplicação, estes são divididos em grupos, como psicrófilos que tem a capacidade de se desenvolver em 0°C a 20°C, com um ótimo entre 10°C e 15°C, psicotróficos que se desenvolvem entre 0°C e 7°C, mesófilos que tem uma temperatura ótima de multiplicação entre 25°C 40°C, mínima entre 5°C e 25°C e máxima de 40°C e 50°C e, termófilos que tem temperatura ótima entre 45°C e 65°C, mínima entre 35°C e 45°C e máxima entre 60°C 90°C. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Quando estoca-se alimentos em atmosfera que contenha gás carbônico, e/ou outros gases que são adicionados ao ambiente, é chamada de estocagem em “atmosfera controlada”, tendo como resultado um retardo da maturação e deterioração causada por fungos. (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

3.2 CONTROLE DE PATOGÊNOS EM ALIMENTOS

Os micro-organismos mais comuns em alimentos são *Salmonella* e Coliformes (*Escherichia coli*). Estes causam doenças devido as toxinas que podem estar presentes no alimento. Geralmente, os alimentos contaminados causam distúrbios gastrointestinais causando diarreia, vomito, dor abdominal e desconforto. (GAVA; FRIAS; SILVA, 2009).

E para a detecção desses micro-organismos são feitas análises microbiológicas em laboratórios para quantificar ou detectar a presença dos micro-organismos, e a partir disso a ANVISA, fez uma legislação, Resolução RDC nº12, de

02 de janeiro de 2001, que é um regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, que é muito usado nos laboratórios, que indica um parâmetro da quantidade de micro-organismos, sendo ele patógeno ou não, que pode estar presente no alimento. (BRASIL, 2001).

3.2.1 Coliformes

Os coliformes são grupos de bactérias que são divididas em coliformes totais e coliformes termotolerantes, tendo como bactéria característica detectada dentro desse grupo de termotolerantes a *Escherichia coli*.

3.2.1.1 Coliformes Totais

Os coliformes totais são um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, e neste grupo estão apenas enterobactérias que fermentam lactose com produção de gás, em temperaturas de 35-37°C. São mais de 20 espécies que se encaixam nessa definição, dentre elas a *Escherichia coli*, que é uma bactéria de origem intestinal de humanos e animais, mas também existem bactérias não entéricas das espécies *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* e entre outras. (SILVA et al; 2010)

3.2.1.2 Coliformes Termotolerantes

Os coliformes termotolerantes, também antes chamado de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais. Esse subgrupo, a princípio, era para selecionar apenas enterobactérias de origem do trato gastrointestinal, por isso o termo coliformes fecais, porém atualmente inclui grupos que não são fecais, por tanto mudando para Coliformes termotolerantes, pois continuam fermentando a lactose em temperaturas elevadas 44,5-45,5°C. (SILVA et al; 2010)

3.2.1.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria, bacilos Gram negativo, não esporuladas. Essa bactéria é a mais isolada em laboratório clínico e, é o principal

micro-organismo em infecções urinárias. Mas, também está sendo isolada de diversos sítios anatômicos do corpo humano, causando variadas patologias. Ela faz parte da flora fecal humana e também tem um papel crucial em contaminação de alimentos. Algumas cepas patogênicas de *E. coli* que produzem uma endotoxina potente pode causar sintomas, como diarreias severas. (SILVA, 1999).

O significado da presença da *E.coli* em um alimento é avaliado de duas formas, primeiro por ser uma enterobactéria que quando detectada no alimento indica contaminação por origem fecal e indicando que as condições higiênicas estão inadequadas. A outra forma é baseada nos fatores de virulência, quando se ingere este tipo de bactéria tem-se manifestações clínicas e epidemiológicas. Então, as diferentes linhagens de *E.coli* são classificadas em 5 grupos, são elas a EPEC (*E.coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*E.coli* enteroinvasora), ETEC (*E.coli* enteroxigênica), EHEC (*E.coli* enterohemorrágica) e a EAaggEC (*E.coli* enteroagregativa). (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A EPEC causa gastroenterite em crianças recém nascidas e em lactentes jovens que tem como sintomas diarreia grave, acompanhado de dores abdominais, vômito e febre. Essa bactéria adere a mucosa do intestino e destrói as microvilosidades das células epiteliais intestinais. Os sintomas duram de 6 horas a 3 dias. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A EIEC penetra nas células epiteliais e causam manifestações clínicas semelhante a *Shigella* sp, com sintomas de disenteria, cólicas abdominais, febre e mal estar geral, eliminando de mucos nas fezes. O quadro sintomático dura de 8 a 24 horas. (ALVES, 2012)

A ETEC fixa-se nas mucosas do intestino delgado e produz toxinas que resultam em diarreia aquosa, chamada de diarreia do viajante, os demais sintomas são febre, cólicas abdominais, fadiga e náuseas que surgem após 8 a 44 horas após ingerir o produto contaminado, e os sintomas duram de 3 a 19 dias. (ALVES, 2012)

A EHEC associada a colite hemorrágica e a Síndrome do Hemolítico-urêmico. No intestino grosso produzem uma toxina chamada verotoxina que causa a morte do enterócito, provocando diarreias sanguinolentas, os sintomas são cólicas abdominais, vômito, diarreia sanguinolenta (colite hemorrágica). Os sintomas duram cerca de 3 a 19 dias. Há dados de que 5% a 10% dos indivíduos que são afetados

por essa estirpe desenvolvem Síndrome Hemolítico-urêmica e Purpura Trombocitopenica trombocítica. (ALVES, 2012).

A EA_gEC, é uma linhagem patogênica descoberta recentemente, no qual não foi muito descrita, parece estar associada a adesão da mucosa intestinal, principalmente no colón, não sendo observada no íleo e no duodeno. Sabe-se que interfere no metabolismo celular do enterócito. Pode estar associada a surtos crônicos de diarreia, mas ainda não foi relatado nenhum caso de surtos de origem alimentar. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.2.2 *Salmonella* sp

A *Salmonella* pertence a família *Enterobacteriaceae*, é um bacilos gram negativo, movem-se com auxílio de flagelo peritricos, são não esporulados e anaeróbios facultativos. A *Salmonella* sp é adquirida pela via fecal-oral. É composta por 6 subespécies que são divididas em mais de 2500 sorotipos. São agentes patogênicos intestinais no homem e nos animais, sendo frequentemente encontrados em alimentos, animais e ambiente. (ALVES, 2012).

A ampla adaptabilidade da *Salmonella* sp permite que ela sobreviva fora do hospedeiro animal/humano, o que facilita sua dispersão no ambiente aumentando o número de reservatórios e, aumentando a probabilidade de infecção. (ALVES, 2012).

As doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em 3 grupos, são elas a febre tifoide causada por *Salmonella typhi*, febre entérica causada por *Salmonella paratyphi* e salmonelose causada pelas demais salmonelas. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A febre tifoide acomete somente o homem e, é transmitida através da água e alimentos contaminados por material fecal humano. Seus sintomas são septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A infecção começa através da penetração nas células epiteliais intestinais, entrando na corrente sanguínea. Esses micro-organismos são fagocitados por macrófagos, dentro das células da bactéria que se multiplicam, essa multiplicação destrói os macrófagos liberando inúmeras bactérias na corrente sanguínea, podendo atingir os órgãos causando uma infecção sistêmica. (ALVES, 2012).

O reservatório da *Salmonella typhi* é o homem, que mesmo não apresentando os sintomas ainda passa a ser portador da bactéria e, esses portadores costumam ser a maior fonte de contaminação para água e alimentos. (ALVES, 2012).

A febre entérica é semelhante a tifoide, porem com sintomas mais brandos de septicemia, vômitos, diarreias e febre. A tifoide tem duração de cerca de 8 semanas, já a entérica dura 3 semanas. A possível causa dessas febres é ingestão de água contaminada, leite cru, masriscos e vegetais crus. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A infecção intestinal causada por *Salmonella* sp e samonelose causa náuseas, vomito, dores abdominais e febre em um período aproximado de 12 a 24 horas. A dose que infecta é totalmente variável, dependendo da espécie de *Salmonella* e das condições do individuo. (GAVA; FRIAS; SILVA; 2009).

Para a prevenção de contaminação por micro-organismos há as Boas Praticas de Fabricação (BPFs) e, as ações corretivas com o objetivo de reduzir a contaminação fecal ao longo de toda cadeia alimentar, assim contribuindo para redução de risco de doenças associadas aos Coliformes e a *Salmonella* sp.(ALVES, 2012).

As Boas Práticas de Fabricação, o controlado pelo processo do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a NBR ISO 22000:2006 visam gerenciar o controle de perigos assegurando a segurança do uso de alimentos. (GAVA; FRIAS; SILVA, 2009).

3.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM ALIMENTOS

Os métodos convencionais foram desenvolvidos há muitos anos e tem sido utilizado em maior parte dos laboratórios de análise microbiológica de alimentos, são internacionalmente aceitos e recomendados pelo *American Public Health Association* (APHA), *International Comission Microbiological Specification for Foods* (ICMSF) e pela *Food na Drug Administration* (FDA). (GOLDBECK, 2008).

A análise microbiológica de alimentos tem como objetivo a detecção e enumeração de um determinado micro-organismo vivo. Por ser um grande número de grupos, gêneros e espécies, são utilizados inúmeros ensaios que podem ser de dois tipos. As análises qualitativas analisam a presença ou ausência do micro-

organismo na amostra em uma dada quantidade, e o ensaio quantitativo determina a quantidade de micro-organismo na amostra, medida por uma massa ou volume. (SILVA et al., 2010).

Cada uma das análises é feita de forma diferente, pois dependem do micro-organismo alvo, mas a maioria desses ensaios utilizam as mesmas técnicas culturais básicas de microbiologia, que são a de presença ou ausência, e contagem pelo Número Mais Provável (NMP). (SILVA et al., 2010).

3.3.1 Métodos convencionais para Coliformes

A técnica de Número Mais Provável (NMP), técnica também chamada de tubos múltiplos, é bastante utilizada para estimar contagem de alguns tipos de micro-organismos, como coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*. Nessa técnica, a amostra após ser homogeneizada deve ser submetida a três diluições decimais seriadas, que serão colocadas em três ou cinco tubos com tubo de Durham para coleta de gás, se houver. (FRANCO; LANDGRAF, 2008)

Os tubos dão positivos para *E. coli* e coliformes com turvação do meio e produção de gás, já *S. aureus* positiva somente com a turvação do meio. Vê-se o número de tubos positivos em cada uma das diluições e, a partir disso denomina-se o Número Mais Provável por grama de produto, tendo como base a tabela de estatística de Hoskins. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A Tabela 3 orienta o uso da tabela NMP em função da quantidade de amostra.

Tabela 3 - Orientação para o uso das Tabelas de NMP, em função da quantidade de amostra presente nas alíquotas e das diluições inoculadas, com limite de detecção da contagem e a regra para conversão do resultado.

	Combinação de diluições*	Quantidade de amostra nas alíquotas (g ou ml)	Limite de detecção (por g ou ml da amostra)	Fator de conversão do resultado na Tabela
1	S/D (100ml) - S/D (10ml) - SD (1ml)	100 - 10 - 1	0,003	dividir por 1.000
2	S/D (10ml) - S/D (1ml) - 10-1 (1ml)	10 - 1 - 0,1	0,03	dividir por 100
3	S/D (1ml) - 10-1 (1ml) - 10-2 (1ml)	1 - 0,1 - 0,01	0,3	dividir por 10
4	10-1 (10ml) - 10-1 (1ml) - 10-2 (1ml)	1 - 0,1 - 0,01	0,3	dividir por 10
5	10-1 (ml) - 10-2 (1ml) - 10-3 (1ml)	0,1 - 0,01 - 0,001	3	direto
6	10-2 (ml) - 10-3 (1ml) - 10-4 (1ml)	0,01 - 0,001 - 0,0001	30	dividir por 10
	10-3 (ml) - 10-4 (1ml) - 10-5 (1ml)	0,001 - 0,0001 - 0,00001	300	dividir por 100

Fonte: Silva et al. (2010, p. 74).

Nota: *Entre parênteses o volume inoculado da diluição, onde o SD = sem diluição (combinação restrita à amostras líquidas.)

3.3.1.1 Método tradicional para detecção de *Salmonella* sp

A técnica de presença/ ausência consiste em um método qualitativo, em que vários ensaios são realizados para identificar *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* sp, *Escherichia coli*. Essas técnicas são utilizadas por meio de enriquecimento em um ou mais caldos específicos e o posterior isolamento em meios sólidos. Essa técnica é qualitativa porque na fase de enriquecimento dificulta a quantificação, porém não sendo impossível a contagem. (SILVA et al., 2010).

Para a detecção da *Salmonella* é feita a técnica de presença ou ausência. A Tabela 4 mostra os métodos convencionais usados para análise.

Tabela 4 - Meios de condições de incubação recomendado pela ISO, FDA e USDA nas diversas etapas de ensaio *Salmonella* em alimentos.

Método ^a	Pré-enriquecimento ^b	Enriquecimento seletivo ^b	Plaqueamento diferencial ^b
ISO 6579 (2007)	BPW a 37±1°C/18±2h ^c	RVS a 41,5±1°C/24±3h MKTTn a 37±1°C/24±3h	XLD a 37±1°C/24±3h 2º Opcional ^e
BAM/FDA (2007)	CL a 35±2°C/24±2h ^c	RV a 42±0,2°C/24±2h TT a 35±2°C/24±2h ou 43±0,2°C/24±2h ^d	HE a 35±2°C/24±2h BS a 35±2°C/24±2h XLD a 35±2°C/24±2h
MLG/FSIS	BPW a 35±2°C/18-24h	RV ou RVS a 42±0,5°C/22-24h TTH a 42±0,5°C/22-24h	BGS a 35±2°C/18-24h XLT4 ou DM-LIA a 35±2°C/18-24h

Fonte: Silva et al. (2010, p.293).

Legenda: ^a **ISO 6579 (2007)** = Método Internacional Organization for Standardization, **BAM/FDA (2007)** = Método do *Bacteriological Analytical Manual Online* da Food and Drug Administration (Andrews & Hammack, 2007), **MLG/FSIS** = Método do *Microbiological Laboratory Guidebook Online* do Food Safety na Inspection Service, United States Departamento of Agriculture (MLG/FSIS, 2008).

^b **BPW** = Água Peptonada Tamponada, **BGS** = Ágar Verde Brilhante Sulfa, **BS** = Ágar Bismuto Sulfito, **CL** = Caldo Lactosado, **DM-LIA** = Ágar Lisina Ferro Duplamente Modificado, **HE** = Ágar Entérico de Hectoen, **MKTTn** = Caldo Tetrionato Muller-Kaufmann Novobiocina, **RV** = Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado, **RVS** = Caldo Rappaport-Vissiliadis Soja, **TT** = Caldo Tetrionato, **TTH** = Caldo Tetrionato Hajna, **XLD** = Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, **XLT4** = Ágar Xilose Lisina Tergitol 4.

^c Há algumas variações, apresentadas descrição do procedimento.

^d Alimentos com baixa carga microbiana 35°C e com alta carga microbiana 43°C.

^e Selecionar um meio adequado para isolamento de cepas lactose positivas e dos sorotipos Typhi e Paratyphi. O Ágar Verde Brilhante (BG) e o Ágar Bismuto Sulfito (BS) podem ser utilizados.

De acordo com a Tabela 4, existem três métodos que podem ser seguidos para a detecção da *Salmonella* spp, são eles a ISO 6975, BAM/FDA E MLG/FSIS, que estão apresentados nos Anexos B.

O pré-enriquecimento em caldo não seletivo tem como objetivo recuperar as células injuriadas incubando essa amostra por pelo menos 18 horas. Os meios mais utilizados são água peptonada e caldo lactosado. (SILVA et al., 2010).

O enriquecimento em caldo seletivo é para inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover o crescimento somente da *Salmonella*. Nesta etapa recomenda-se o uso de dois meios seletivos para enriquecimento, pois a resistência da *Salmonella* varia de cepa para cepa, os meios que podem ser utilizados para

essa técnica são Rappaport-Vassiliads Modificado ou Rappaport-Vassiliads de Soja. O plaqueamento seletivo diferencial é para promover o crescimento de colônias características da *Salmonella*, o que a distingue de outros micro-organismos. Na etapa de plaqueamento recomenda-se o uso de mais de um tipo de meio de cultura, são o Ágar Enterico Hectoen, o Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e o Ágar Xilose Lisina Tergitol 4. Como as cepas de *Salmonella* fermentam a lactose ou produzem H₂S, é importante que a segunda ou terceira opção de meio não seja baseada nessas duas características, como por exemplo o Ágar Verde Brilhante que fermenta a lactose e não produz H₂S e o Ágar Bismuto Sulfato que não fermenta lactose mas produz H₂S. A confirmação acontece após o crescimento de colônias características da *Salmonella*, e por provas bioquímicas ou sorológicas. (SILVA et al., 2010).

Na verificação por soro são feitas por meio de testes de aglutinação com anti-soros polivalentes, que verificam a presença dos antígenos 'O', 'Vi' e 'H'. (SILVA et al., 2010).

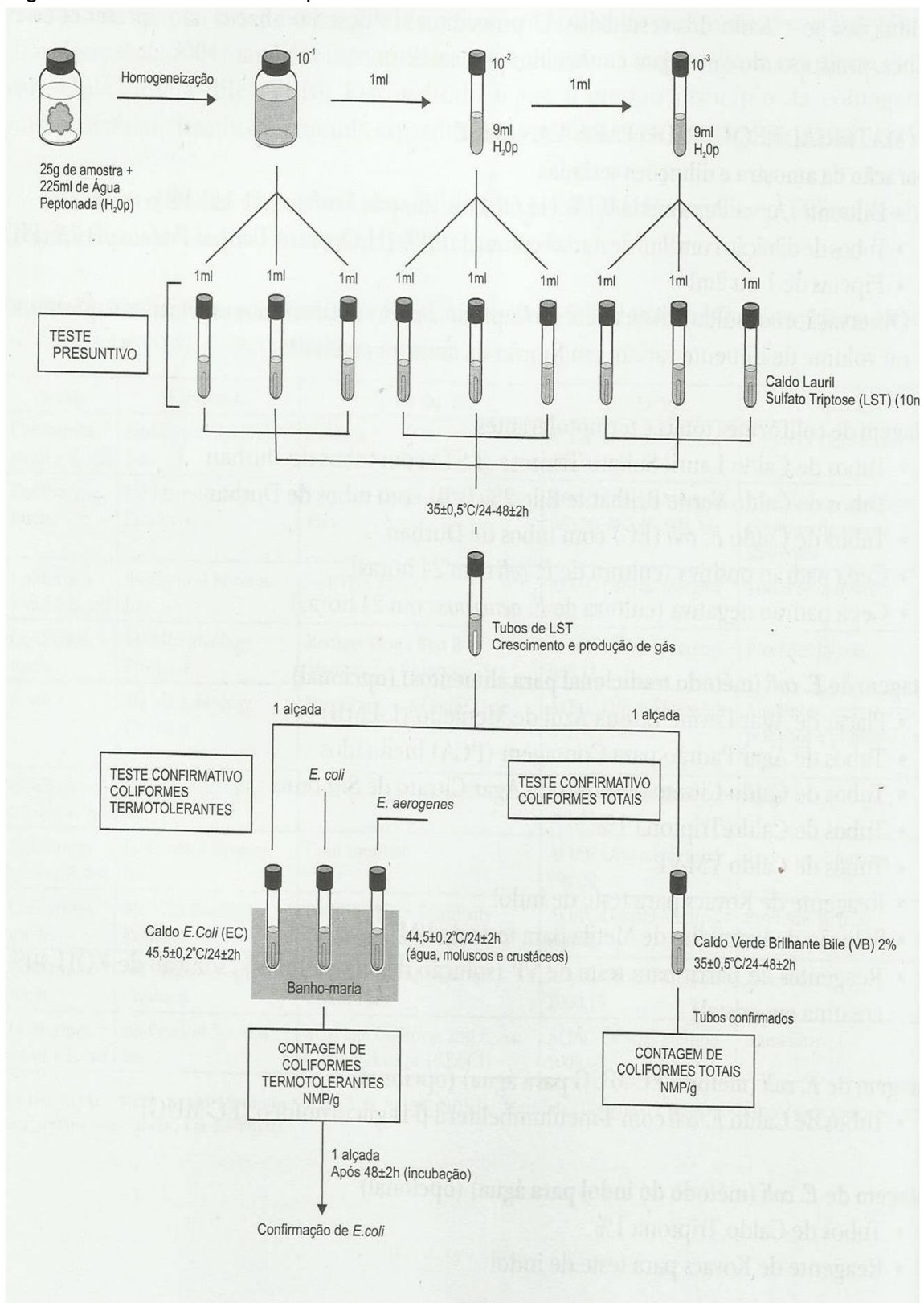
Nas provas bioquímicas é recomendado que se use os 'kits' comerciais, TSI (Ágar Triplice Açúcar Ferro), Ágar Uréia de Christensen, Caldo Descarboxilase Lisina, Caldo VM-VP, Caldo Triptona 1% e 0,25ml de salina estéril + gota de Tolueno para realizar um número maior de provas e, assim verifica o perfil de *Salmonella entérica* subesp. *Entérica*. (SILVA et al., 2010).

3.3.1.2 Método de detecção de Coliformes

O método para detecção de coliformes recomendado pela *Food and Drug* (FDA) consiste no método NMP, em que a inoculação é feita em tubos com o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com Durhan, que evidenciam um teste positivo, para o isolamento de Coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, como seguem as Figuras 7 e 8. (SILVA, 2002).

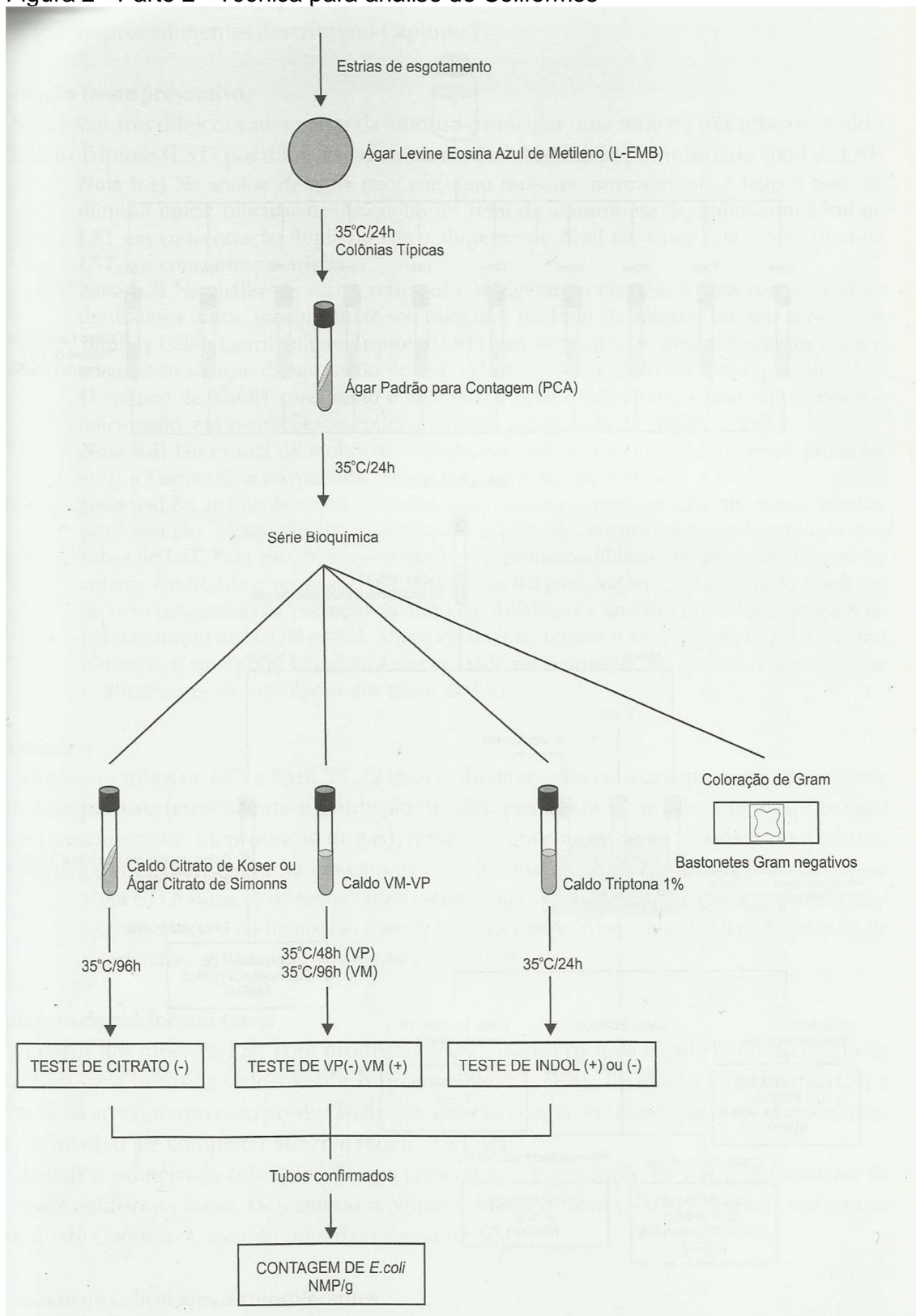
A Tabela de NMP está apresentada no Anexo A.

Figura 1 - Parte 1 - Técnica para análise de Coliformes



Fonte: Silva et al. (2010, p. 138).

Figura 2 - Parte 2 - Técnica para análise de Coliformes



Fonte: Silva et al. (2010, p. 139).

Nessa análise são feitas as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , e depois são usados 9 tubos de LST, fazendo a triplicata de cada diluição e adicionando 1mL do inoculo e incubando a 35°C/48h. Se houver turvação e crescimento de gás do meio segue-se para os testes confirmatórios, que são usados os meios caldo Verde Brilhante Bile (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC) em tubos com Durhan, que se positivam com a presença de gás e turvação. Para inocular, os tubos LST positivo, passa-se apenas uma alçada para o caldo EC e incuba-se em banho-maria a 45°C/24h e para o caldo VB incuba-se em estufa padrão a 35°C/24h. Nestes testes verifica-se a contagem de Coliformes totais (VB) e coliformes termotolerantes (EC). Caso der positivo para coliformes termotolerantes continua o teste confirmatório para *Escherichia coli* em com Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB), que será incubado a 35°C/24h, se assim continuar positivando passa-se para as provas bioquímicas. (SILVA et. al., 2010)

3.3.2 Métodos Rápidos

Os métodos rápidos consistem em testes para detecção de micro-organismos em alimentos, assim como os convencionais, porém esses testes são mais práticos e realizados em menos tempo, pois nos métodos convencionais em geral demora-se de 5-7 dias para obtenção dos resultados.

A seguir serão apresentados os métodos rápidos usados para detecção de *Salmonella* e coliformes.

3.3.2.1 *Salmonella*

Existem uma grande quantidade de métodos rápidos que podem ser usados para identificação da *Salmonella* sp, sendo eles mais simples e mais rápidos, tendo “kits” que foram desenvolvidos com marca registrada e oficializados pela AOAC (*Association of Analytical Chemists*). (SILVA et al., 2010).

A Figura 9 mostra os “kits” disponíveis para análise

Figura 3 - "Kits" analíticos oficializados pela AOAC para detecção da *Salmonella*

Análitos	Fabricante	Nome do "kit"	Validação	Aplicação
<i>Salmonella</i> spp	Organon Teknika	<i>Salmonella</i> Tek	AOAC Official Methods 986.35; 987.11; 993.08	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	Neogen Corporation	GENE TRAK <i>Salmonella</i> Assay	AOAC Official Method 987.10	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	BioControl Systems, Inc.	1-2 Test	AOAC Official Method 989.13	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	TECRA Diagnostics	TECRA <i>Salmonella</i> VIA	AOAC Official Method 989.14	alimentos, correlatos e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	Neogen Corporation	GENE TRAK <i>Salmonella</i> DLP Assay	AOAC Official Method 990.13	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	BioControl Systems, Inc.	Assurance <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 992.11	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	BioMérieux Inc.	VIDAS (SLM) Immunoassay	AOAC Official Methods 996.08; 2004.03	todos os alimentos
<i>Salmonella</i> spp	Rhone-Poulenc Diagnostics	LOCATE ELISA	AOAC Official Method 997.16	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	BioControl Systems, Inc.	Assurance Gold <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 999.08	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	BioControl Systems, Inc.	VIP for <i>Salmonella</i>	AOAC Official Method 999.09	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	TECRA Diagnostics	TECRA <i>Salmonella</i> Unique	AOAC Official Method 2000.17	alimentos, correlatos e amostras ambientais
<i>Salmonella</i> spp	BioMérieux Inc.	VIDAS Immuno-Concentration <i>Salmonella</i> (ICS)	AOAC Official Methods 2001.07; 2001.08; 2001.09	todos os alimentos
<i>Salmonella</i> spp	Qualicon Inc.	Bax System	AOAC Official Method 2003.09	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	BioMérieux Inc.	VIDAS (SLM) Immunoassay	AOAC Official Method 2004.03	alimentos
<i>Salmonella</i> spp	Neogen Corporation	GeneQuence <i>Salmonella</i> DNA Hybridization Method	AOAC Official Method 2007.02	aves, ovos, leite, chocolate, rações

Fonte: Silva et al. (2010, p. 295).

De acordo com a Figura 3 observa-se que existem vários métodos rápidos para a detecção de *Salmonella* em alimentos.

Porém atualmente, existem mais métodos que foram validados pela AOAC como segue na Figura 4.

Figura 4 – “Kits” analíticos oficializados pela AOAC

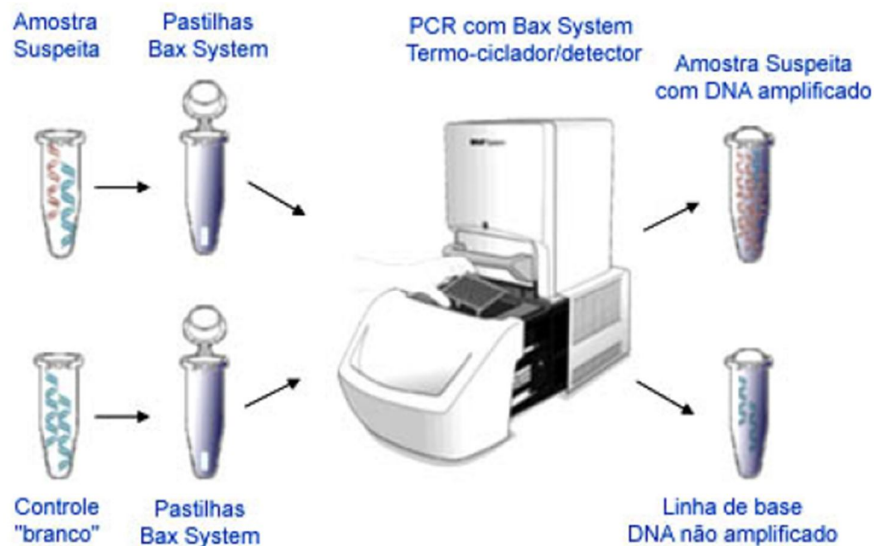
Nome do "kit"	Fabricante	Analitos	Nome do "kit"	Fabricante	Analito
Singlepath Salmonella Lateral Flow Assay	Merck KgaA / EMD Chemicals, Inc.	<i>Salmonella</i> spp	MicroSEQ Salmonella spp. Detection Kit	ThermoScientific	<i>Salmonella</i> spp
R.A.P.I.D. LT Food Security System (FSS) for Salmonella Detection	BioFireDX.com (formerly Idaho Technology)	<i>Salmonella</i> spp	Transia Plate Salmonella Gold	BioControl Systems, Inc.	<i>Salmonella</i> spp
Oxoid Salmonella Rapid Test	Oxoid Ltd.	<i>Salmonella</i> spp	Thermo Scientific SureTect Salmonella species PCR Assay	Thermo Fisher Scientific	<i>Salmonella</i> spp
RapidChek Salmonella Assay	Romer Labs	<i>Salmonella</i> spp	RAPID'Salmonella Agar	Bio-Rad	<i>Salmonella</i> spp
RapidChek SELECT Salmonella Test	Romer Labs	<i>Salmonella</i> spp	iQ-Check Salmonella II Real-Time PCR Test Kit	Bio-Rad	<i>Salmonella</i> spp
GeneDisc Plate Salmonella spp.	Pall GeneDisc Technologies	<i>Salmonella</i> spp	GENE-UP Salmonella	bioMerieux, SA	<i>Salmonella</i> spp
InstantLabs Salmonella Species Food Safety Kit	InstantLabs Medical Diagnostics Corporation	<i>Salmonella</i> spp	Check & Trace Salmonella	Check-Points BV	<i>Salmonella</i> spp
mericon Salmonella spp. Kit	Qiagen GmbH	<i>Salmonella</i> spp	Veriflow Salmonella species	Invisible Sentinel	<i>Salmonella</i> spp
ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection system for Salmonella	AES Chemunex	<i>Salmonella</i> spp	Surefood PREP Salmonella & SureFood PATHOGEN Salmonella PLUS V/R/LC	Congen Biotechnologie GmbH	<i>Salmonella</i> spp
BBL CHROMagar Salmonella	BD Diagnostics	<i>Salmonella</i> spp	DNABLE Molecular Detection Kit for Salmonella	Envirologix.com	<i>Salmonella</i> spp
MicroSEQ Salmonella spp. Detection Kit Linked to Pathatrix Salmonella spp. pooling	ThermoScientific	<i>Salmonella</i> spp	Salmonella Rapid Culture Method using ONE Broth-Salmonella & Brilliance Salmonella	Remel & Oxoid (part of ThermoFisher Scientific)	<i>Salmonella</i> spp
ADIAFOOD Detection System: Salmonella species	bioMerieux, s.a.	<i>Salmonella</i> spp	3M Petrifilm Salmonella Express	3M Food Safety	<i>Salmonella</i> spp

Fonte: AOAC (2015)

Nota: Modificada pela autora.

O método *Bax System* é automatizado e consiste na técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), uma técnica biomolecular que cria milhares de cópias de fragmentos do DNA alvo, que é da *Salmonella*. O “kit” acompanha tubos com pastilhas que contêm os reagentes tampão de lise e a protease. A Figura 5 apresenta o ensaio do método. (KILLNER, 2008)

Figura 5 – Ensaio da metodologia *Bax System*.



Fonte: Killner (2008)

Esse método rápido usa o pré-enriquecimento da mesma forma que o método tradicional, 25g da amostra em 225g de caldo lactosado ou água peptonada, incubado a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 16-20h. E para o enriquecimento é colocado 10 μl do pré-enriquecimento em um tubo que contém BHI, que é incubado a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 3h para a realização do teste, após essa etapa é passado 5 μl do tubo de BHI para um tubo de 200 μl de tampão de lise e adicionado de protease (150 μl de proteinase K em 12ml de tampão de lise). Em seguida, a amostra é aquecida a 37°C por 20 minutos, depois aumenta-se a temperatura para 95°C por 10 minutos e, para finalizar a amostra é resfriada para $4-8^\circ\text{C}$ por 5 minutos, e é nessa etapa que é feita a fragmentação em uma velocidade maior de DNA. A última etapa é pipetar 50 μl dessa amostra para um tubo com as pastilhas de PCR, que será colocado no aparelho Termociclador/Detector, para verificar se há a presença ou a ausência da *Salmonella*. (KILLNER, 2008).

A técnica TECRA *Salmonella* Unique consiste em uma técnica imunoenzimática, em módulos plásticos formados por 6 tubos enumerados e um bastão plástico com anticorpos. Nos tubos do 1 ao 6 contém solução tampão, solução de lavagem, caldo de enriquecimento, conjugado, solução de lavagem e substrato, respectivamente. Contém bastões que tem os anticorpos em envelope lacrado, e no “kit” contem a cor de cada bastão onde deve ser empregado. A Figura 6 mostra imagens do teste. (PAULA, 2002).

Figura 6 – “Kit” TECRA *Salmonella* UNIQUE



Fonte: Paula (2002)

Para esse método o pré-enriquecimento é feito do modo tradicional, 25g da amostra pode ser diluída em 225 mL de água peptonada ou caldo lactosado. Em seguida, inicia-se o teste transferindo 4 mL da amostra para o tubo 1, que após ser colocado a amostra é inserido um bastão, que foi incubado a 36°C por 20 minutos, nesse bastão contem os anticorpos purificados com alta especificidade que capturam qualquer micro-organismo contido no meio. Na segunda etapa, esse bastão é colocado no tubo 2, que passou por lavagem, fazendo 1 inversão para a *Salmonella* tenha contato com o anticorpo que contem no bastão, e o tubo 1 é fechado com tampa plástica. Em seguida, transfere-se para o tubo 3, que contem o caldo M, que é o caldo de enriquecimento, que corresponde ao período de replicação da *Salmonella* e incuba-se a 35-37°C por 5 horas. Depois, o bastão é transferido para o tubo 4 que contem o conjugado que forma uma enzima

cromogênica ligada ao anticorpo específico da *Salmonella*, e incuba-se a 35-37°C por 30 minutos. Após esse período, transfere-se para o tubo 5 e se faz lavagem com 2 inversões para tirar o excesso de conjugado e, para finalizar a amostra é transferida para o tubo número 6 que contém o substrato da enzima do conjugado que é incubado a 20-25°C ou a temperatura ambiente por 10 minutos. Os resultados positivos ou negativos são obtidos através da presença ou ausência de cor do bastão. (PAULA, 2002).

3.3.2.2 *Coliformes*

Para os coliformes existem os métodos alternativos que são os métodos rápidos para análise de alimentos. Para a realização desses métodos são usados “kits” prontos, que são oficializados pelas AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), como segue na Figura 7.

Os métodos rápidos também são quantitativos, podendo ser lidos através do método NMP (Número Mais Provável). (SILVA et al., 2010).

Figura 7 - “Kits” analíticos oficializados pela AOAC para contagem de coliformes totais e/ ou *E.coli* em alimentos

Analito	Fabricante	Nome do "kit"	Validação	Aplicação
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	BioControl Systems Inc.	Colitrak	AOAC Official Method 966.24	Todos os alimentos
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	3M Microbiology Products	Petrifilm Coliform Count Plate	AOAC Official Methods 986.33, 989.10,991.14	Carnes, aves, pescados e produtos de pesca, alimentos
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	BioControl Systems Inc.	ColiTrak Plus	AOAC Official Method 988.19	Todos os alimentos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Redigel Violet Reblie Medium for Coliform	AOAC Official Method 989.11	Produtos lacteos
<i>E.coli</i>	3M Microbiology Products	Petrifilm <i>E. coli</i> Count Plate	AOAC Official Methods 991.14; 998.08	Alimentos, carnes, aves, pescados e produtos de pesca
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	Idexx Laboratories Inc.	Colilert	AOAC Official Method 991.15	Água
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	BioControl Systems Inc.	ColiComplete	AOAC Official Method 992.30	Todos os alimentos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Petrifilm High Sinsitivity Coliform Count Plate	AOAC Official Method 996.02	Produtos lacteos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Petrifilm Rapid Coliform Count Plate	AOAC Official Method 2000.15	Alimentos
<i>E. coli</i>	BioControl Systems Inc.	SimPlate Coliform and <i>E.coli</i> Color Indicator (Cec-CI)	AOAC Official Method 2005.03	Alimentos

Fonte: Silva et al. (2010, p 136).

Atualmente atualizado, a quantidade de “kits” disponíveis para análise de Coliformes/*Escherichia coli*, como segue na Figura 5.

Figura 8 – “Kits” analíticos oficializados pela AOAC

Nome do "kit"	Fabricante	Analitos
3M Petrifilm AQCC	3M Food Safety	Coliformes
Chromocult Coliform Agar ES	Merck KgaA / EMD Chemicals, Inc.	Coliformes
Sanita-kun Coliforms	JNC Corporation	Coliformes
Compact Dry CF	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	Coliformes
Soleris/MicroFoss Coliform Test	Neogen Corporation/FOSS A/S	Coliformes
TEMPO CC (Coliform Count)	bioMerieux, s.a.	Coliformes
Compact Dry EC	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	Coliformes/ <i>E.coli</i>
Sanita-Kun E.coli & Coliform Sheet Medium & RIDA Count E.coli/Coliform	JNC Corporation	Coliformes/ <i>E.coli</i>
MicroSnap Coliform & E.coli	Hygiena LLC	Coliformes/ <i>E.coli</i>
Combined E.coli and Total Coliform Test	ENDETEC	Coliformes totais/ <i>E.coli</i>
RAPID E.coli 2 Agar	Bio-Rad	Coliformes totais/ <i>E.coli</i>
DOX 60F/30F Coliforms & E.coli	Bio-Theta, Ltd.	Coliformes totais/ <i>E.coli</i>
Chromocult Coliform Agar	Merck KgaA / EMD Chemicals, Inc.	Coliformes totais/ <i>E.coli</i>

Fonte: AOAC (2015)

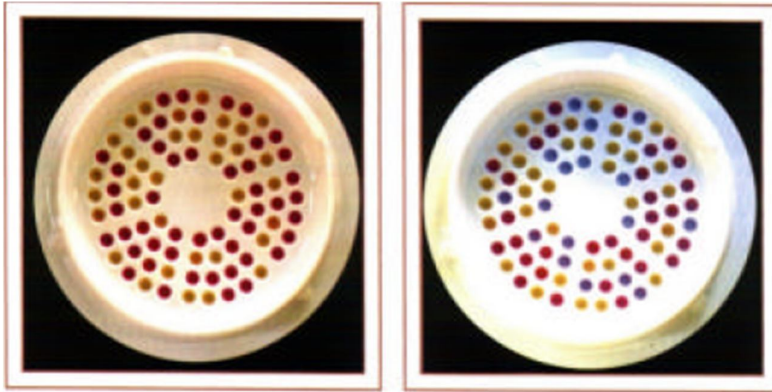
Nota: Modificado pela autora.

O método *Simplate* é um “kit” comercial para quantificar mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais e *E.coli* em alimentos. Esse método consiste em uma placa de 84 cavidades para inoculação da amostra em meio liofilizados. Após a inoculação a placa é incubada a 35°C por 24h e, em seguida observa-se a presença de fluorescência. (SILVA, 2002).

O substrato é composto por 2,6 g de meio liofilizado reidratado com 100 mL de água destilada esterilizada, essa quantidade é feita para 10 placas. É colocado 1 mL de cada diluição do alimento no centro da placa e 9 mL do substrato, após a

inoculação da amostra em placa, faz-se movimentos circulares para que toda a amostra passe pelas cavidades da placa. Como segue na Figura 9. (SILVA, 2002).

Figura 9 – *Simpla*te coliformes totais e *E.coli*



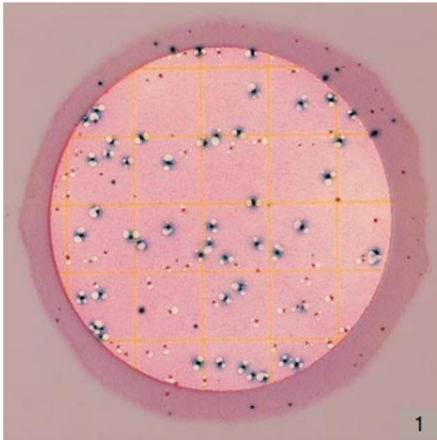
Fonte: Silva (2002)

O método *Petrifilm EC* (*Petrifilm E.coli Count Plate*) consiste em placas composta por dois filmes estéreis e reidratáveis, impregnados pelo meio de cultura e por substâncias geleificantes solúveis em água. (SILVA et. al., 2010).

Para a análise é feita a preparação como no método tradicional, usando 225mL de água peptonada ou caldo lactosado com 25g da amostra, assim fazendo diluições decimais a partir de 10^{-1} . (CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Uma certa quantidade de amostra (1 mL) é inoculada nas placas, seguindo instruções do fabricante. Essas placas são incubadas a 35°C por 24-48h. Para leitura e confirmação de coliformes e *E.coli* verifica-se se há o crescimento de colônias vermelhas de coliformes e azuis com produção de gás para *E. coli* e, a partir desse crescimento é feito a contagem em UFC/g. (CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Figura 10 – “Kit” *Petrifilm* com a presença de *E.coli* e coliformes totais



Fonte: Multimedia3M (2009)

3.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS TRADICIONAIS E RÁPIDOS

É feita uma comparação dos métodos apresentados, métodos rápidos e convencionais, apresentando suas vantagens e desvantagens.

3.4.1 *Salmonella*

A comparação para detecção de *Salmonella* é feita pelo método convencional e os métodos rápidos Bax System e TECRA *Salmonella* UNIQUE.

3.4.1.1 *Comparação entre método Bax System e método convencional ISO 6579:2002*

Killner (2008) analisou 244 amostras de variados tipos de alimentos, e considerando o método convencional ISO 6579:2002 verificou-se que 50 amostras foram positivas para *Salmonella* spp. (KILLNER, 2008).

Pelos resultados obtidos pode-se verificar que das 50 amostras positivas para *Salmonella* spp, 21 amostras (42%) pertenciam ao grupo carnes e produtos cárneos. O grupo de frangos, ovos e produtos avícolas apresentou 15 amostras positivas, o que corresponde a 30% das amostras positivas, já no grupo farelo de soja 18% e no grupo de outros produtos verificou-se uma contaminação de 10% das amostras. (KILLNER, 2008).

As mesmas amostras foram analisadas pelo método *Bax system*, um método aprovado desde 2003, notou-se que 15 das 50 amostras positivas (30%) pela metodologia de referência foram simultaneamente positivas. (KILLNER. 2008).

O resultado analítico do método *Bax System* tem uma porcentagem de concordância quando comparada ao método convencional ISO 6579:2002 de 92%. Entretanto, no método rápido se obtiveram resultados presuntivos positivos que não foram confirmados, caracterizando como falso-positivo. (KILLNER, 2008).

Através dos dados obtidos, observa-se que o método convencional e o método rápido *Bax System* tem a mesma eficiência, sendo assim tendo vantagens de ser um método que se obtém o resultado mais rápido que o convencional; porém esse método é usado somente para triagem devido a resultados falso-positivos, assim tendo que confirmar com o método convencional. (KILLNER, 2008).

3.4.1.2 Comparação entre o método TECRA Salmonella UNIQUE e o método convencional

Para a detecção de *Salmonella*, Paula (2002) analisou 200 amostras de alimentos e verificou-se que 45 amostras (22,5%) foram positivas para *Salmonella* spp. Sendo que, 34 amostras (75,6%) foram detectadas pelo método convencional e 27 (60%) pelo sistema TECRA *Salmonella* Unique, um método aprovado desde 2000.

O número total de amostras com resultados presuntivos positivos para *Salmonella* utilizando o sistema TECRA *Salmonella* UNIQUE foi de 47. Entre essas amostras, 27 (57,4%) foram confirmadas como *Salmonella* spp e os demais resultados (42,5%) foram considerados falso-positivos. (PAULA, 2002).

A análise apresenta a relação entre os resultados positivos confirmados e negativos obtidos pelo método rápido TECRA *Salmonella* UNIQUE e pelo método convencional. Conforme os resultados apresentados verificou-se que somente 10 amostras foram positivas para *Salmonella* pelo método TECRA *Salmonella* UNIQUE e, não sendo detectada pelo método convencional. Sendo assim, o método tradicional deixou de detectar 37% das amostras positivas para *Salmonella*. Pelo método convencional foram detectadas 34 amostras positivas, sendo que 17 amostras foram positivas somente pelo método convencional e em 17 amostras foram

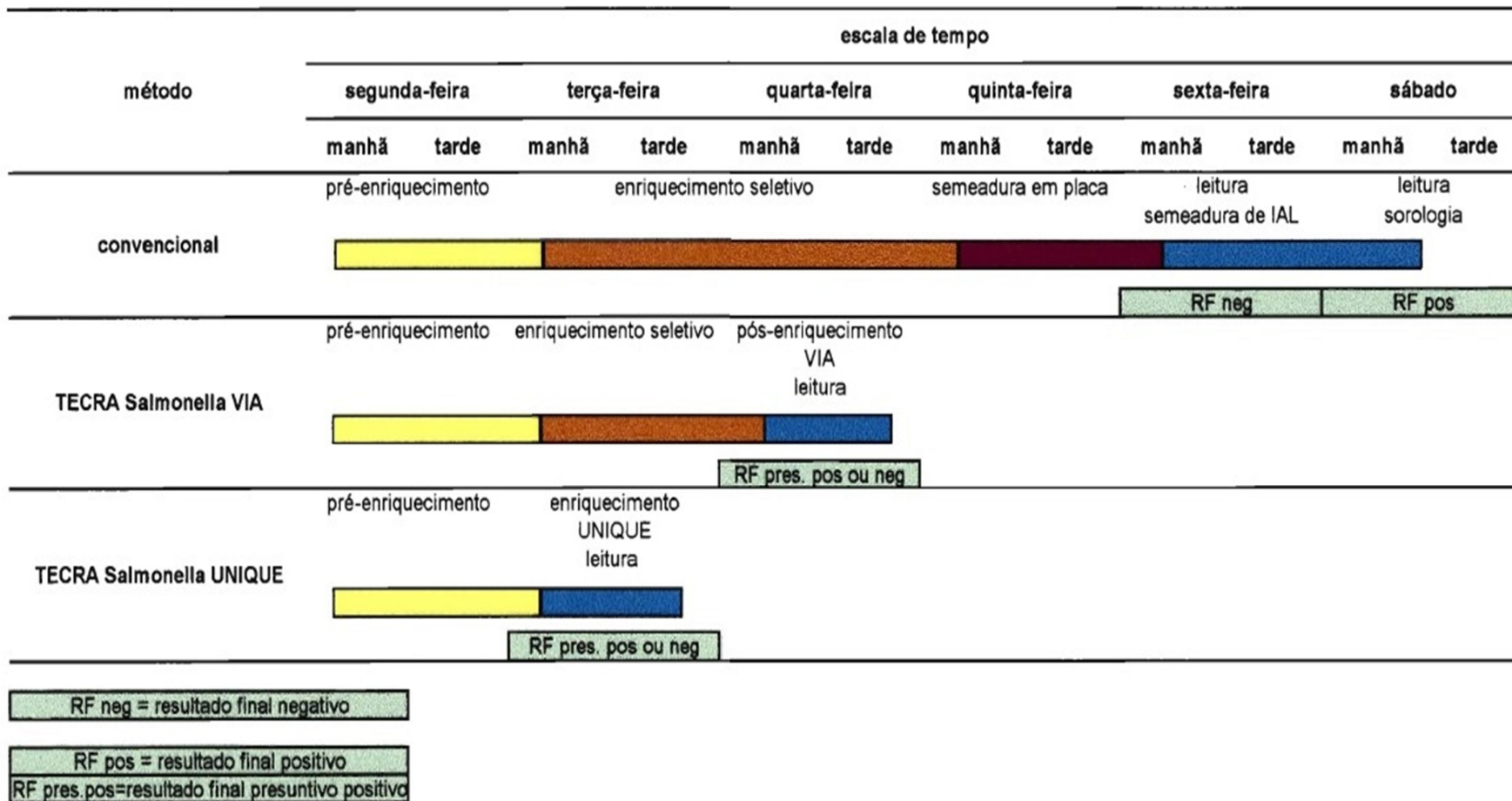
verificadas a presença de *Salmonella* pelo método TECRA *Salmonella* UNIQUE e método convencional. Sendo assim, verificou-se que o método TECRA *Salmonella* UNIQUE não foi eficiente na detecção de 17 amostras positivas. Dessa forma, a porcentagem de resultado falso-negativo para essa técnica de método rápido, tem a porcentagem de 50% em relação ao método convencional e 40% em relação do total de amostras positivas para *Salmonella*. (PAULA, 2002).

Em estudos anteriores, o sistema TECRA *Salmonella* UNIQUE foi comparado com o método convencional, FDA, para pesquisa de *Salmonella*, e apresentou elevada concordância entre os dois métodos; sendo que o método rápido detectou mais micro-organismo do que o método convencional. Sendo assim, esse estudo mostrou a conveniência da utilização do método rápido, que é feito em 20-22 horas, quando comparado a 4 dias necessárias para o resultado do método FDA. (PAULA, 2002).

Então, através dos dados obtidos observa-se que a sensibilidade de ambos os métodos são similares, pois os dois testes conseguem fazer a detecção da *Salmonella* com precisão e com variação não significativa. O método rápido TECRA *Salmonella* UNIQUE tem como vantagem o tempo de análise que dura de 20-22 horas, enquanto o método convencional ISO 6579:2002 demora aproximadamente 5 dias para obter o resultado. Quando se compara os dois métodos verifica-se que o método rápido é de fácil execução e também possui economia de material, porém quando os resultados dão presuntivos positivos pode ser necessária a confirmação através do método convencional, já o método convencional é mais trabalhoso em sua execução. (PAULA, 2002).

Na Figura 11 segue a comparação do tempo necessário para detecção da *Salmonella*.

Figura 11 - Quadro comparativo do tempo necessário para o desenvolvimento dos três métodos para detecção de *Salmonella* em alimentos



Fonte: Paula (2002).

3.4.2 Coliformes

Dentre os coliformes é apresentada a comparação do método rápido de tubos múltiplos com os métodos rápidos *Petrifilm* EC e *Simplate*.

3.4.2.1 *Petrifilm*

A comparação da técnica convencional de tubos múltiplos e de *Petrifilm* EC para detecção de coliformes totais foi realizado com linguiça. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

De 56 amostras de linguiça verificou-se que em 37 (66%) os resultados foram positivos pelo método rápido e convencional para coliformes termotolerantes, observando que o limite máximo para *E.coli* no *Petrifilm* EC foi o mesmo pelo método convencional para coliformes a 45°C. Entretanto, observou que em 19 amostras de linguiça os resultados foram divergentes pelos tubos múltiplos e pelo *Petrifilm*, resultando em negativo para o método convencional e positivo para o método rápido, que teve contagens superiores estimadas pelos tubos múltiplos, como mostra na Tabela 5. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 5 – Contagens de *E.coli* pelos tubos múltiplos e Petrifilm EC mostrando os resultados divergentes e 19 amostras de lingüiça, considerando o limite máximo para coliformes 45°C estabelecido pela legislação brasileira.

Amostras lingüiça	<i>E. coli</i> tubos múltiplos(NMP/g)*	<i>E. coli</i> Petrifilm (UFC/g)
4	Ausente	1,0.10 ⁵
14	Ausente	2,0.10 ⁴
15	Ausente	2,0.10 ⁴
25	Ausente	7,3.10 ³
26	Ausente	6,0.10 ³
39	Ausente	1,2.10 ⁴
47	Ausente	3,7.10 ⁴
48	Ausente	2,8.10 ⁴
10	9,0.10 ²	3,0.10 ⁴
36	2,1.10 ³	1,0.10 ⁴
41	4,0.10 ²	2,0.10 ⁴
43	3,0.10 ²	1,2.10 ⁴
44	7,0.10 ²	1,5.10 ⁴
46	1,5.10 ³	2,1.10 ⁴
18	4,0.10 ²	1,0.10 ⁴
42	3,0.10 ²	1,6.10 ⁴
37	9,0.10 ²	6,0.10 ³
38	4,0.10 ²	1,3.10 ⁴
45	2,3.10 ³	1,4.10 ⁴

Fonte: Silva; Cavalli; Oliveira (2006)

Nota: *limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para coliformes a 45°C: 5x10³g

Estudos feitos por outros autores consideram que a placa de Petrifilm EC é uma boa alternativa para contagem de coliformes e *E.coli* em amostras de carne; e sendo que este método é validado pelo AOAC. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Das 19 amostras que deram positivas para coliformes termotolerantes, 11 não foram positivas para *E.coli* através dos tubos múltiplos, porém 8 deram positivas para *E.coli* através do método Petrifilm, com contagens elevadas, resultando mais um vez na divergência dos métodos, como mostra na Tabela 6.(SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 6 - Resultados das análises de lingüiça com contagens de *E.coli* somente pelo método Petrifilm EC, considerando o limite máximo para *E.coli* equivalente a coliformes 45°C.

Amostras lingüiça	<i>E. coli</i> tubos múltiplos (NMP/g)*	<i>E. coli</i> Petrifilm (UFC/g)
4	Ausente	1,0.10 ⁵
14	Ausente	2,0.10 ⁴
15	Ausente	2,0.10 ⁴
25	Ausente	7,3.10 ³
26	Ausente	6,0.10 ³
39	Ausente	1,2.10 ⁴
47	Ausente	3,7.10 ⁴
48	Ausente	2,8.10 ⁴
22	Ausente	1,0.10 ³
27	Ausente	1,0.10 ³
50	Ausente	3,0.10 ³

Fonte: Silva; Cavalli; Oliveira (2006)

Nota: *limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para coliformes a 45°C: 5x10³g

Os resultados evidenciaram que em alimentos de origem animal o método convencional de tubos múltiplos não detectou *E. coli* em muitas amostras, enquanto as contagens do micro-organismo foram superiores no método Petrifilm EC. Além disso, a técnica do método convencional tem a desvantagem de ser trabalhosa, levar uma semana para obtenção dos resultados e necessitar de grandes quantidades de vidraria e meios de cultura. Apesar de ser considerado um método padrão, está sujeito a vários tipos de interferência, tais como, presença de bactérias antagonistas e de inibidores naturais do meio seletivo. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Outra possibilidade de interferência pode ter sido a matriz alimentar, já que a diferença nas contagens de *E. coli* ocorreu com amostra de lingüiça. Embora não tenha sido possível saber quais temperos foram usados na amostra pelos fabricantes, esses podem ter prejudicado na detecção de *E. coli* nos meios seletivos de tubos múltiplos. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Das 11 amostras, 10 tubos haviam ausência de produção de gás no caldo EC. Essa ausência de gases pode estar relacionada a presença de bactérias não coliformes que competem pela lactose, levando então a produção insuficiente de gás. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Observou-se que a presença de coliformes termotolerantes não prova necessariamente que a contaminação é de origem fecal. E o método rápido *Petrifilm* EC se destacou na eficiência e maior sensibilidade para detecção de *E. coli*, além de apresentar vantagens como rapidez nos resultados, praticidade nas contagens de colônias e com identificação bioquímica complementar de 48 horas no máximo. (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

3.4.2.2 *Simplite*

Silva (2002) analisou 18 alimentos pelo método convencional, de tubos múltiplos, e método rápido *Simplite*, para detecção de coliformes totais.

Os resultados das análises são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Contagem de coliformes totais em alimentos

CONTAGEM			CONTAGEM		
Alimento	3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlateNMP/ g ou ml	Alimento	3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlateNMP/g ou ml
Carne Bovina A1	2,4x10 ⁴	1,5x10 ³	Maçã	ND	2,0x10 ²
Carne Suína A2	2,4x10 ⁴	2,3x10 ³	A10	ND	2,0x10 ²
Frango A3	4,6x10 ⁴	3,0x10 ³	Pera	ND	4,0x10 ²
Linguixa A4	1,1x10 ²	8,8x10 ¹	A11	9,3x10 ¹	4,0x10 ¹
Peixe A5	1,1x10 ²	4,0x10 ¹	Tomate	2,4x10 ²	1,4x10 ²
Fígado A6	4,3x10 ³	5,1x10 ³	A12	9,3x10	2,0x10 ¹
Leite Cru A7	3,9x10 ³	4,7x10 ³	Alface	9,3	2,0x10 ¹
Queijo A8	2,3x10 ³	4,4x10 ³	A13	2,4x10 ¹	2,0x10 ¹
logurte A9	1,1x10 ²	1,6x10 ²	Cheiro Verde	9,3	2,0x10 ¹
	1,1x10 ²	4,0x10 ¹	A14	2,4x10 ⁶	3,9x10 ⁴
	4,6x10 ¹	4,0x10 ¹	A15	3,4x10 ⁶	4,4x10 ⁴
	ND	1,6x10 ³		2,4x10 ⁶	7,4x10 ⁴
	ND	6,2x10 ²		2,4x10 ⁵	8,4x10 ³
	ND	5,8x10 ²		2,4x10 ⁵	7,4x10 ⁴
	4,6x10 ³	2,0x10 ²		2,4x10 ⁵	6,2x10 ⁴
	1,1x10 ⁴	6,0x10 ²		ND	4,0x10 ²
	4,6x10 ³	6,0x10 ²		ND	8,0x10 ²
	2,4x10 ²	4,6x10 ²		ND	4,0x10 ²
	4,6x10 ²	2,2x10 ²		1,1x10 ⁴	4,7x10 ⁴
	4,6x10 ²	3,2x10 ²		4,6x10 ³	4,7x10 ⁴
	ND	ND		1,1x10 ⁴	4,4x10 ⁴
	ND	ND		1,1x10 ⁴	1,4x10 ³
	ND	ND		1,1x10 ⁴	1,4x10 ³
	ND	ND		1,1x10 ⁴	1,2x10 ³
	ND	ND		2,4x10 ¹	2,0x10 ²
	ND	ND		1,5x10 ¹	2,0x10 ²
	ND	ND		2,4x10 ¹	2,0x10 ²

Fonte: Silva (2002).

Foram feitas análises com alimentos de origem animal e vegetal, e o alface foi o que teve maior nível de contaminação de coliformes totais nas duas metodologias. A maioria dos alimentos apresentou crescimento em ambos os métodos, as contagens foram maiores no método convencional, e algumas tiveram contagens maiores no *Simplate*, porém durante a execução do método houve alteração da cavidade antes de ser incubado, apresentando resultados falso-positivos, porém esse caso ocorreu não só na detecção de coliformes no alface, mas também em outros alimentos. Se tal fato não ocorreu com maioria dos alimentos, pode-se

considerar um método adequado para enumeração de coliformes totais, com recuperação maior de células ou UFC quando comparado ao método convencional de tubos múltiplos. (SILVA, 2002).

Nesses mesmos alimentos foram analisados os coliformes termotolerantes/*E. coli* pelo método convencional e pelo *Simpla*te e, os valores obtidos seguem na Tabela 8.

Tabela 8 - Coliformes termotolerante/*Escherichia coli* em alimentos.

Alimento	CONTAGEM		Alimento	CONTAGEM	
	3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlateNMP /g ou ml		3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlateNMP/g ou ml
Carne Bovina	<0,3	<10	Maçã	0,3	<10
A1	<0,3	<10	A10	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10
Carne Suína	4,6X10	<10	Pera	<0,3	<10
A2	9,3	<10	A11	<0,3	<10
	9,3	<10		<0,3	<10
Frango	4,3	4,0x10 ¹	Tomate	<0,3	<10
A3	3,5	2,0x10 ¹	A12	<0,3	<10
	2	2,0x10 ¹		<0,3	<10
Linguiça	<0,3	1,6x10 ²	Alface	6,4	4,0x10 ¹
A4	<0,3	2,0x10 ¹	A13	2,3	4,0x10 ¹
	<0,3	2,0x10 ¹		4,3	4,0x10 ¹
Peixe	<0,3	4,0x10 ¹	Cheiro Verde	<0,3	<10
A5	<0,3	2,0x10 ¹	A14	<0,3	<10
	<0,3	2,0x10 ¹		<0,3	<10
Fígado	<0,3	2,0x10 ²	Repolho	<0,3	<10
A6	<0,3	2,0x10 ²	A15	<0,3	<10
	<0,3	2,0x10 ²		<0,3	<10
Leite Cru	<0,3	3,8x10 ²	Cenoura	2,4x10 ²	<10
A7	<0,3	1,0x10 ²	A16	2,4x10 ²	<10
	<0,3	2,6x10 ²		2,4x10 ²	<10
Queijo	<0,3	<10	Beterraba	<0,3	<10
A8	<0,3	<10	A17	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10
logurte	<0,3	<10	Amendoim	<0,3	<10
A9	<0,3	<10	A18	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10

Fonte: Silva (2002).

Nas 18 amostras que foram analisadas, somente 8 (44%) apresentaram crescimento de coliformes termotolerantes/*E. coli*, e dessas 8 amostras positivas, 6 apresentaram contagens maiores no método rápido *Simpla*te. (SILVA, 2002).

Nas análises de cenoura e carne suína detectou-se coliformes termotolerantes nos tubos múltiplos e não no método *Simpla*, porém pode ter sido pelo fato de que o sistema de método rápido é específico para crescimento de *E. coli*, e pode ter tido a presença de outros micro-organismos do grupo dos coliformes termotolerantes. (SILVA, 2002).

Na comparação dos métodos, o método *Simpla* não se mostra um método viável, quando comparado a técnica convencional, pois para alguns alimentos, essa técnica parece sofrer interferência por vários agentes, como o crescimento de bactérias não fecais. Portanto, para os alimentos analisados, o método convencional é o mais adequado. (SILVA, 2002).

4 CONCLUSÃO

Através desse trabalho verificou-se que a deterioração dos alimentos ocorre pela presença de micro-organismos, e estes podem se replicar e alterar a qualidade do alimento deixando-o impróprio para consumo. Os micro-organismos contaminantes podem ser patogênicos e assim causar intoxicações e infecções alimentares.

Para controlar a contaminação com micro-organismos patogênicos, são feitas análises microbiológicas com o objetivo de verificar a qualidade microbiológica do alimento e, assim evitar doenças do trato gastrointestinal, causando sintomas como diarreia, vômito e dores abdominais.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) instituiu através da RDC nº12, 02 de janeiro de 2001, que dá parâmetros da quantidade de micro-organismos permitidos em determinado alimento, passando desses padrões é considerado contaminado e impróprio para consumo humano. Entre essas análises microbiológicas existem dois métodos, o convencional e o rápido. Essas técnicas são específicas para detecção de determinados micro-organismos, que no caso os métodos estudados são para detecção de *Salmonella* spp e Coliformes totais e termotolerantes/*E.coli*.

Para a detecção de *Salmonella* são utilizados em laboratório métodos convencionais ISO, BAM e MLG e os métodos rápidos, foram citados os *Bax System* e o *TECRA Salmonella Unique*, que consistem em métodos mais fáceis e rápidos, enquanto os métodos convencionais, embora mais usados, são mais demorados para obtenção dos resultados. A leitura é feita através da técnica de presença ou ausência do micro-organismo. Os diferentes métodos têm sensibilidades semelhantes, porém em técnicas de métodos rápidos, os resultados presuntivos positivos, precisam ser confirmados pelos métodos convencionais, pois pode resultar em falso-positivo ou falso negativo, e por isso esses métodos são usados somente para triagem. Entretanto, teria a vantagem de ser um método rápido, de fácil execução e econômico.

Para a detecção de Coliformes, os métodos convencionais se apresentam em tubos múltiplos, que é feita a enumeração através de Número Mais Provável (NMP), assim fazendo a quantificação de micro-organismos presentes nos alimentos. E para detecção por métodos rápidos, podem ser usados os métodos *Petrifilm EC* e

Simplat. O *Petriefilm* é um método mais sensível que o método convencional, enquanto o método *Simplat* se torna inviável quando comparado ao método convencional, por poder ter interferências causadas por crescimento de outros micro-organismos de origem não fecal que comprometem a detecção do micro-organismos em estudo.

Portanto, apesar de alguns métodos rápidos serem mais sensíveis que os convencionais, não são suficientes para detecção do micro-organismos que se procura, pois em alguns casos é necessário o auxílio do método de convencional para a confirmação do resultado.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, V. P. P. Propriedades da água e sua importância na estabilidade de alimentos in-natura e processados. **Ciências dos alimentos**, 2013. Disponível em: <<https://cienciasdosalimentos.wordpress.com/2013/03/15/propriedades-da-agua-e-sua-importancia-na-estabilidade-de-alimentos-in-natura-e-processados/>>. Acesso em: 15 out. 2015.
- ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 out. 2015.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2008.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos**: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008.
- KILLNER, M. **Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção de *Salmonella* spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental**: avaliação em condições reais e simultâneas de uso. 2008 . 161f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PAULA, A. M. R. **Detecção de *Salmonella* em alimentos crus de origem animal empregando imunoenaios rápidos TECRA™ *Salmonella* VIA, TECRA™ *Salmonella* UNIQUE e o método convencional de cultura**. 2002. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate^R TPC-CI e Petrifilm^R AC e os métodos convencionais de contagem em placas de mesófilos em sorvetes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, SP, v. 22, n. 1, p. 60-64, jan./abr. 2002.
- SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia**: um texto ilustrado. Teresópolis: Eventos, 1999.
- SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate**. 2002. 75f. Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão de coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas de tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de Coliformes Totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, SP, v. 26, n. 2, p. 352-359, abr./jun. 2006.

SILVA, N. et. al. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água.** 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

INTERNACIONAL, AOAC. **Association of Official Analytical Chemists.** 2015.

Disponível em :

<http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC_Member/RICF/RI_Main.aspx?WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&CCO=8> Acesso em: 12 dez 2015

3M MICROBIOLOGIA. **Placa para contagem de E.coli e Coliformes.** Sumaré, SP, 2009. Disponível em: < <http://multimedia.3m.com/mws/media/586857O/guia-interpret-petrefilm-ecoli-e-coliformes.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2015.

ANEXO A - TABELA NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Tabela 1 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 – 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP / g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP / g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-1	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: Silva et al. (2010).

Tabela 2 - Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de cinco tubos. Quantidade inoculada na amostra: 0,1 – 0,01 e 0,001g ou ml

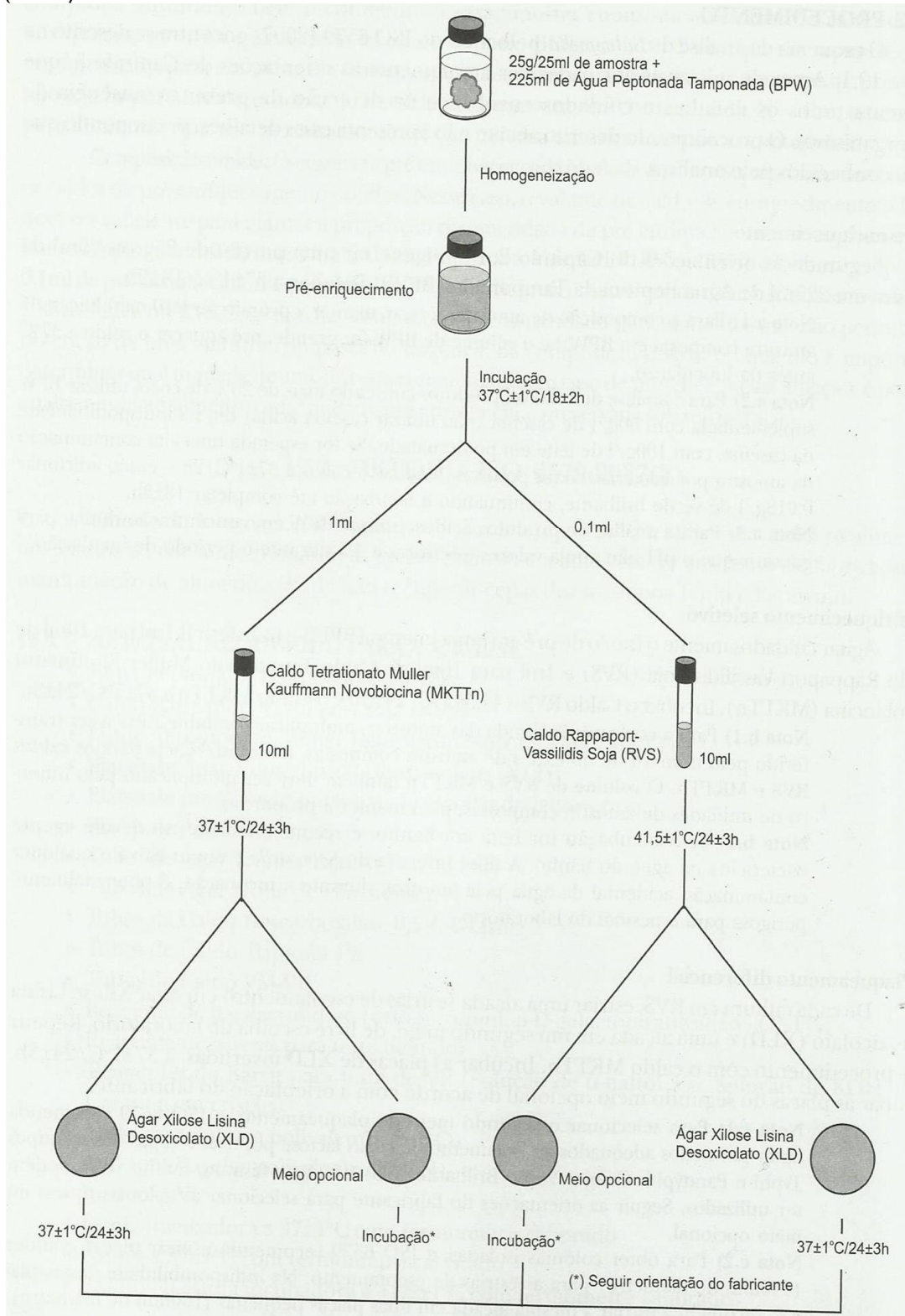
Combinação de tubos +	NMP / g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP / g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<1,8	-	6,8	4-0-3	25	9,8	70
0-0-1	1,8	0,09	6,8	4-1-0	17	6	40
0-1-0	1,8	0,09	6,9	4-1-1	21	6,8	42
0-1-1	3,6	0,7	10	4-1-2	26	9,8	70
0-2-0	3,7	0,7	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5,5	1,8	15	4-2-0	22	6,8	50
0-3-0	5,6	1,8	15	4-2-1	26	9,8	70
1-0-0	2	0,1	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4	0,7	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6	1,8	15	4-3-0	27	9,9	70
1-1-0	4	0,7	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6,1	1,8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8,1	3,4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6,1	1,8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8,2	3,4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8,3	3,4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3,5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3,5	22	5-0-0	23	6,8	70
2-0-0	4,5	0,79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6,8	1,8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9,1	3,4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6,8	1,8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9,2	3,4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4,1	26	5-1-2	63	22	150

2-2-0	9,3	3,4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4,1	26	5-2-0	49	15	130
2-2-2	14	5,9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4,1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5,9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5,9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7,8	2,1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3,5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5,6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3,5	26	5-3-3	180	70	400
3-1-1	14	3,6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5,7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6,8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6,8	40	5-4-3	280	10	710
3-3-0	17	6,8	40	5-4-4	350	10	710
3-3-1	21	6,8	40	5-4-5	430	150	1.100
3-3-2	24	9,8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6,8	40	5-5-1	350	100	1.100
3-4-1	24	9,8	70	5-5-2	540	150	1.700
3-5-0	25	9,8	70	5-5-3	920	220	2.600
4-0-0	12	4,1	35	5-5-4	1.600	400	4.600
4-0-1	17	5,9	36	5-5-5	>1.600	700	-
4-0-2	21	6,8	40				

Fonte: Silva et al. (2010).

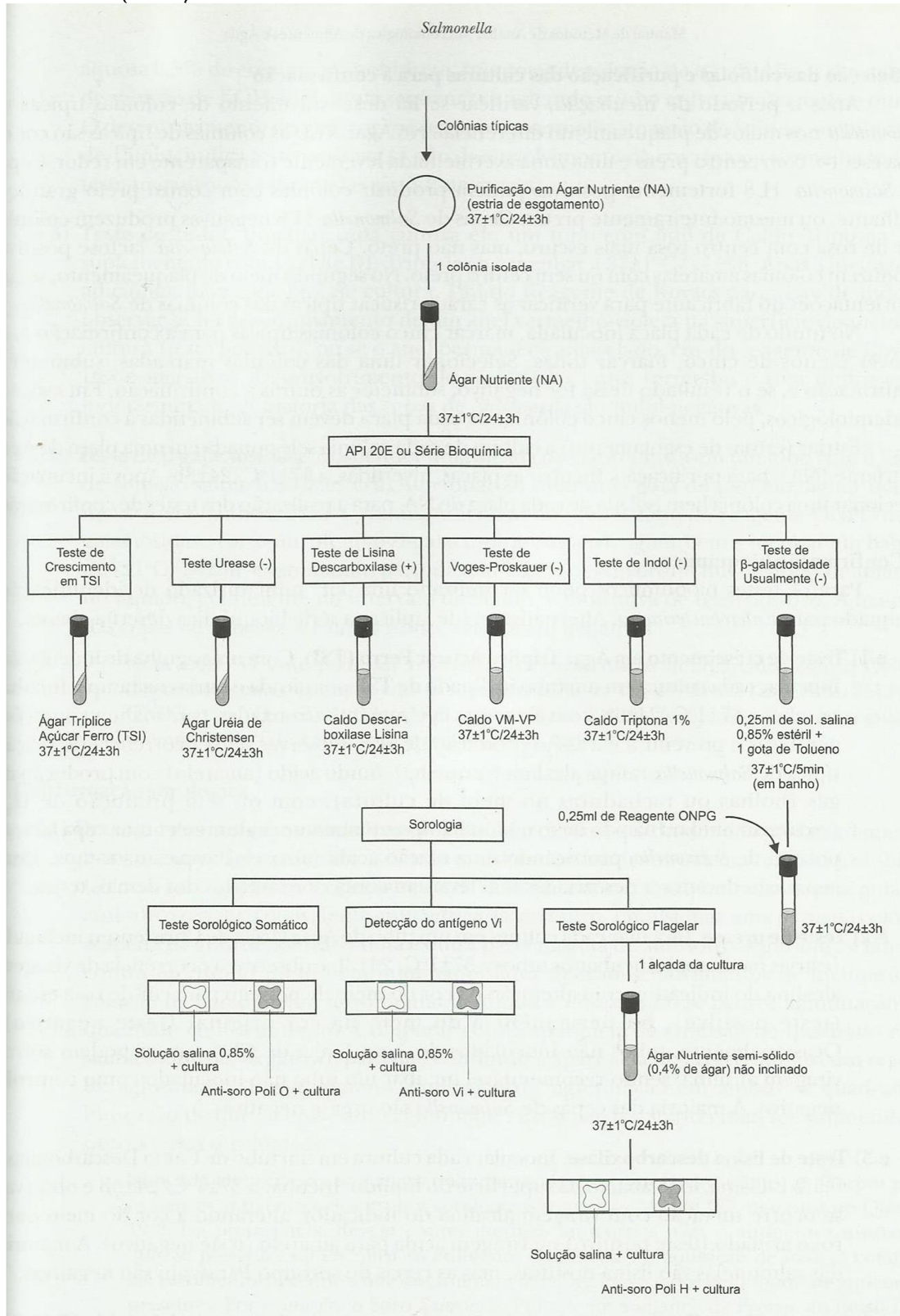
**ANEXO B – ESQUEMAS DE ANALISES PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA*
SP**

Figura 1 - Parte 1 - Esquema da análise de *Salmonella* pelo método ISO 6579 (2007)

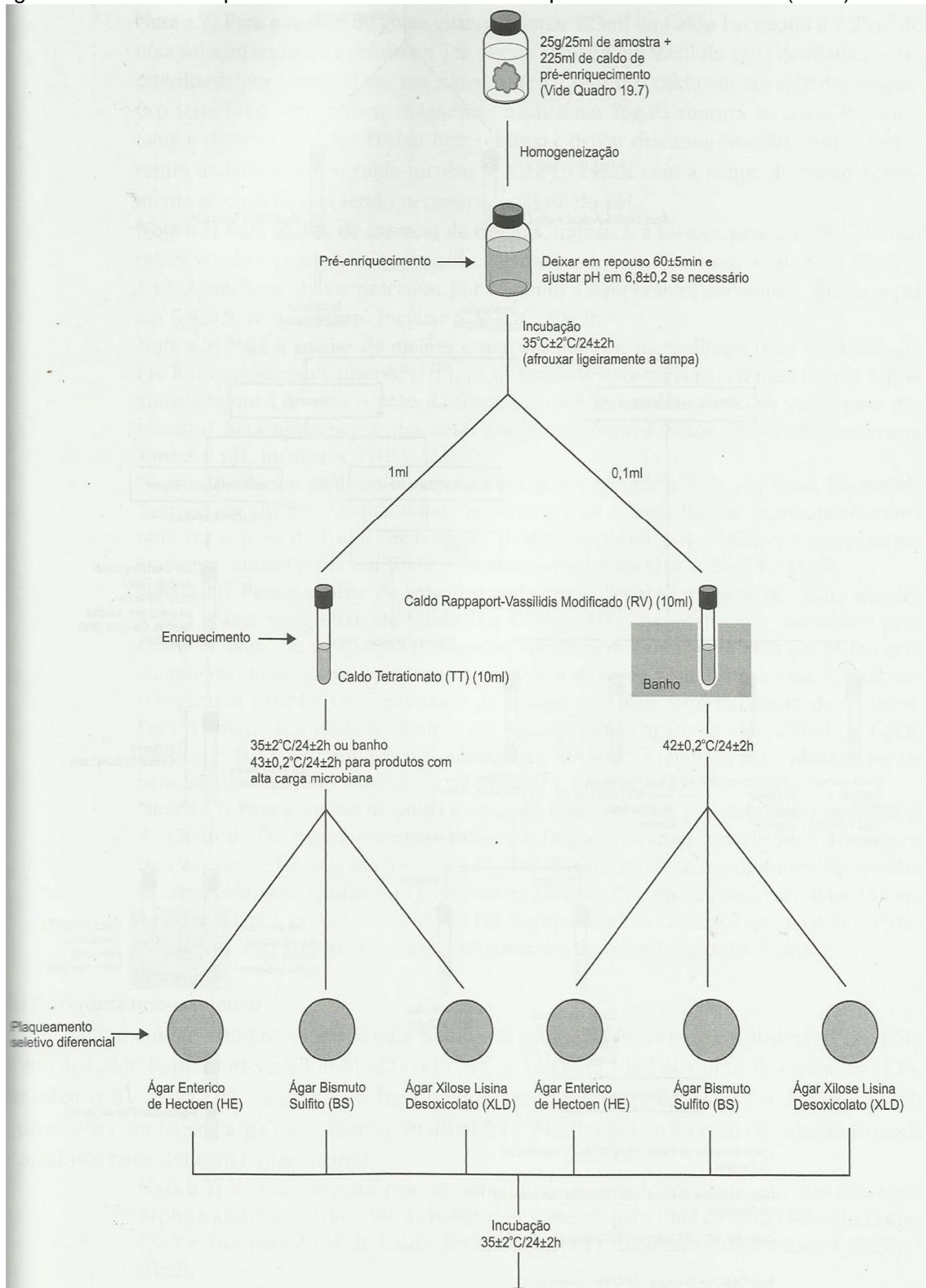


Fonte: Silva et al. (2010, p. 298)

Figura 2 - Parte 2 - Esquema da análise de *Salmonella* pelo método ISO 6579 (2007)

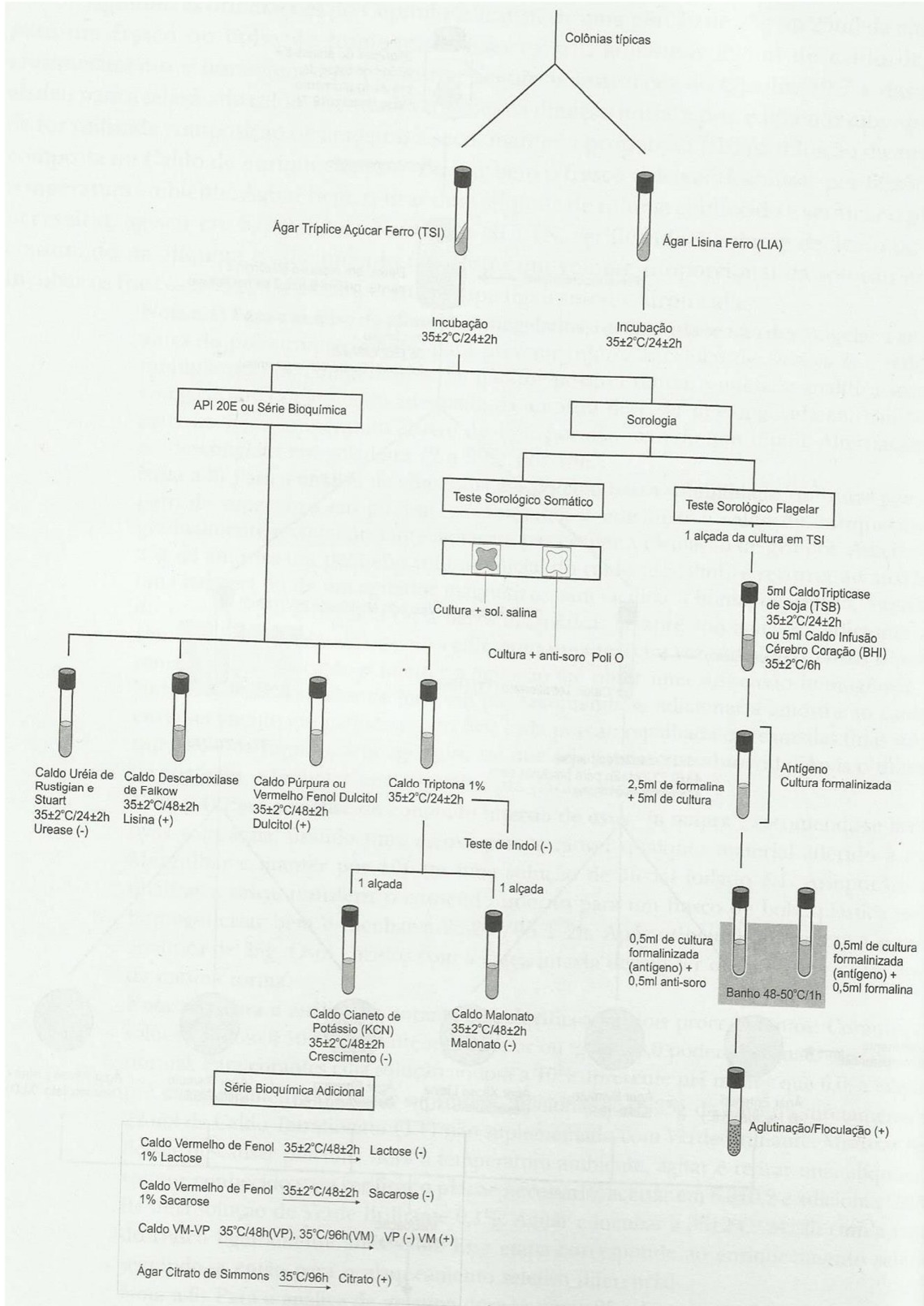


Fonte: Silva et al. (2010, p. 299).

Figura 3 - Parte 1 - Esquema de análise de *Salmonella* pelo método BAM/FDA (2007)

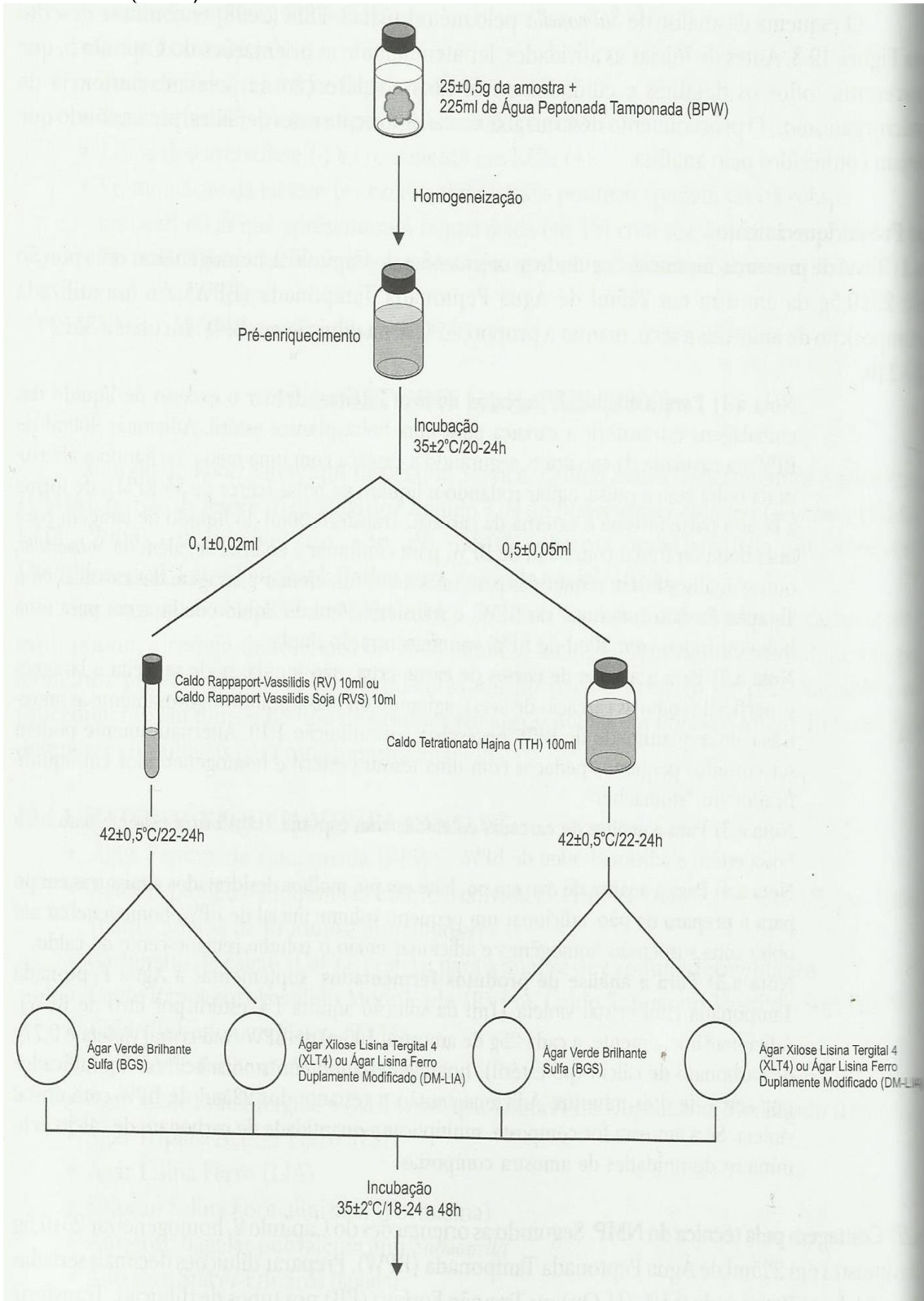
Fonte: Silva et al. (2010, p. 305).

Figura 4 - Parte 2 - Esquema da análise de *Salmonella* pelo método BAM/FDA (2007)

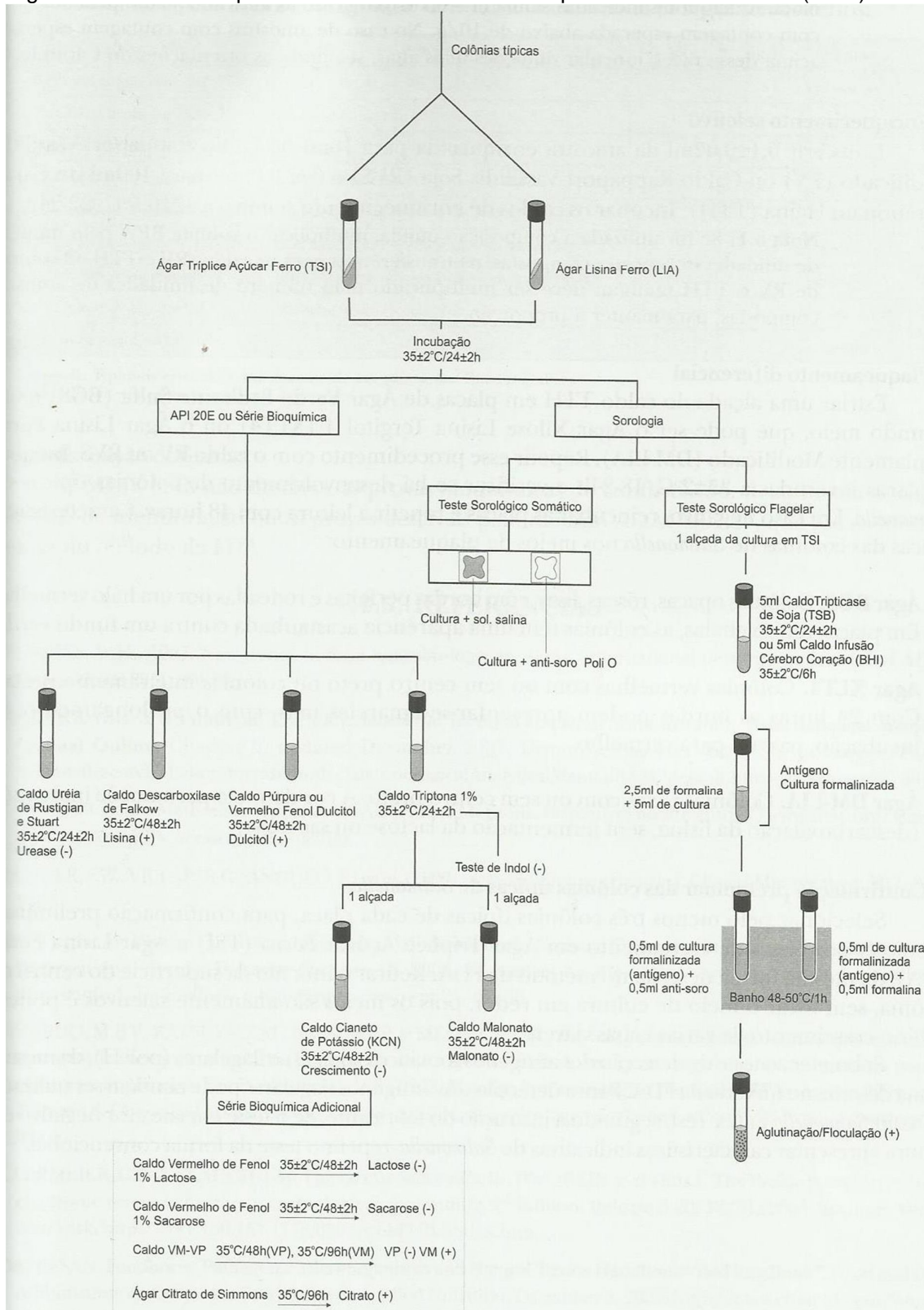


Fonte: Silva et al. (2010, p. 306).

Figura 5 - Parte 1 - Esquema de análise de *Salmonella* pelo método MLG/FSIS (2008)



Fonte: Silva et al. (2010, p.316).

Figura 6 - Parte 2 - Esquema de análise de *Salmonella* pelo método MLG/FSIS (2008)

Fonte: Silva et al. (2010, p. 317).