



# **Validação Interna das Técnicas VIDAS LMO2 e VIDAS Easy SLM em Géneros Alimentícios**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre na área de Sistemas de  
Prevenção e Controlo Alimentar

**Clara Maria Madeira  
Cunha**

**ORIENTADOR**

Doutora

Ana Maria Gomes  
de Sousa Neves

**CO-ORIENTADOR**

Engenheira

Maria João Rodolfo

Aos meus avós

# Agradecimentos

Os meus primeiros agradecimentos são para a Professora Coordenadora Ana Maria Gomes de Sousa Neves e para a Engenheira Técnica Maria João Rodolfo, pela valiosa e dedicada orientação científica, desde a formulação da ideia até à revisão crítica da presente dissertação. O meu sincero obrigado pelas críticas e sugestões que tanto enriqueceram este trabalho.

Ao Centro Tecnológico das Indústrias do Couro (CTIC), nas pessoas do Director geral Doutor Alcino Martinho e da Engenheira Aida Marques, pelo excelente e caloroso acolhimento.

Aos colaboradores do laboratório de microbiologia do CTIC, Carla Carvalho e Luís Santos, pela disponibilidade, atenção e ajuda.

A todos os colaboradores do CTIC pelo apoio, incentivo e agradável ambiente de trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado de 2008 pela amizade e companheirismo.

A todos os meus amigos pelo apoio, incentivo, compreensão e carinho, especialmente ao Rui Casal pelas palavras de encorajamento, ajuda incansável e enorme amizade.

À minha família pelo amor incondicional e paciência infinita.

# Resumo

## Validação Interna das Técnicas VIDAS LMO2 e VIDAS *Easy* SLM em Géneros Alimentícios

*Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. constituem dois importantes agentes de doenças de origem alimentar. Uma rápida monitorização da sua presença, nos géneros alimentícios, pode ser alcançada através de diversos métodos alternativos aos métodos de referência complexos, dispendiosos e demorados. Sendo necessária a validação destes métodos alternativos para demonstrar que o seu desempenho é, pelo menos, igual ao do método de referência. Este trabalho descreve a validação interna das técnicas VIDAS LMO2 e VIDAS *Easy* SLM. Foram analisados vinte e quatro produtos alimentares, quinze dos quais com contaminação microbiológica desconhecida e nove foram artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Foi efectuado um estudo de comparação de métodos de acordo com a ISO 16140:2004 e foram calculadas a exactidão relativa, a sensibilidade relativa e a especificidade relativa. Obteve-se um valor de 100 % em todos estes parâmetros para as duas técnicas, considerando-se que ambas se encontram adequadas à utilização pretendida.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., validação de métodos analíticos, exactidão relativa, especificidade relativa, sensibilidade relativa.

# Abstract

## Internal Validation Techniques VIDAS LMO2 and VIDAS Easy SLM in Food

*Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. are two important agents of food-borne diseases. A quick monitoring of their presence in food can be achieved through several methods that can replace the reference methods that are labor-intensive, costly and time-consuming. Nevertheless the validation of these alternative methods is required to demonstrate that its performance is at least equal to the reference method. This study describes the internal validation techniques VIDAS LMO2 and VIDAS Easy SLM. Twenty four food products were analyzed, of which fifteen have unknown microbiological contamination and nine were artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. A comparison study was performed in accordance with ISO 16140:2004 and relative accuracy, relative sensitivity and relative specificity were calculated. We obtained a value of 100 % in all these parameters for both techniques considering that both are suitable for their intended use.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., methods validation, relative accuracy, relative specificity, relative sensitivity.

# Índice Geral

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>ii</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice Geral .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Preâmbulo .....</b>	<b>xvii</b>
<b>I – Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
I.1. Acreditação de laboratórios .....	2
I.2. Validação de métodos analíticos.....	4
I.2.1. Conceito de validação .....	4
I.2.2. Âmbito de aplicação.....	4
I.2.3. Importância da validação de métodos .....	5
I.2.4. Ferramentas utilizadas na validação de métodos analíticos .....	5
I.2.5. Protocolo de validação .....	6
I.2.6. Parâmetros de desempenho do método .....	6
I.2.6.1. Métodos qualitativos .....	7
I.2.6.2. Métodos quantitativos .....	7
I.3. Condições de ensaio.....	8

I.3.1. Pessoal.....	8
I.3.2. Ambiente .....	8
I.3.3. Equipamento .....	9
I.3.4. Material .....	9
I.3.5. Preparação de meios de cultura.....	10
I.4. Análise microbiológica dos alimentos .....	11
I.4.1. Microrganismos indicadores .....	11
I.4.2. Métodos de referência .....	11
I.4.2.1. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
I.4.2.2. Detecção de <i>Salmonella</i> spp. ....	12
I.4.3. Métodos alternativos .....	13
I.4.3.1. Métodos físicos .....	13
I.4.3.2. Métodos químicos .....	13
I.4.3.3. Métodos moleculares .....	14
I.4.3.4. Métodos imunológicos .....	14
I.4.4. Limitações da análise microbiológica dos alimentos.....	15
I.4.4.1. Matriz .....	15
I.4.4.2. Duração do ensaio .....	16
I.4.4.3. Sensibilidade do método .....	16
I.4.4.4. Células fragilizadas .....	16
I.4.4.5. Células viáveis mas não cultiváveis .....	17
I.5. O equipamento <i>mini VIDAS</i> .....	18
I.5.1. Geral.....	18
I.5.2. Módulo analítico .....	19
I.5.3. Sistema de detecção .....	20
I.5.4. Controlo da temperatura.....	20

I.5.5. Embalagem de reagentes .....	20
I.5.5.1. Barrete simples de reagentes .....	20
I.5.5.2. Cones .....	22
I.5.6. Calibração .....	22
I.5.7. Dados de fabrico .....	23
I.5.8. Resultado do teste .....	24
I.5.9. Princípio de funcionamento dos testes .....	25
I.5.10. Quality Control VIDAS .....	26
I.5.11. VIDAS <i>Heat &amp; Go</i> .....	27
I.6. Enquadramento e Objectivos .....	28
<b>II – Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>29</b>
II.1. Introdução .....	30
II.1.1. Caracterização de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
II.1.1.1. Caracterização bioquímica .....	30
II.1.1.2. Caracterização sorológica .....	31
II.1.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência .....	31
II.1.2. Reservatórios .....	32
II.1.3. Ambiente de processamento dos alimentos .....	32
II.1.4. Presença nos alimentos .....	33
II.1.5. Listeriose.....	35
II.1.5.1. Etiologia .....	35
II.1.5.2. Mecanismos de patogenicidade .....	37
II.1.5.3. Epidemiologia .....	37
II.2. Material e métodos .....	39
II.2.1. Meios de cultura .....	39

II.2.2. Amostras .....	39
II.2.3. Preparação das amostras .....	41
II.2.4. Preparação da suspensão inicial .....	41
II.2.5. Contaminação artificial das amostras .....	41
II.2.6. Controlos Bacteriológicos .....	41
II.2.6.1. Controlo de crescimento positivo .....	41
II.2.6.2. Controlo de crescimento negativo .....	42
II.2.6.3. Branco .....	42
II.2.6.4. Controlo de especificidade .....	42
II.2.7. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	42
II.2.7.1. Método de referência .....	44
II.2.7.2. Método alternativo .....	44
II.2.8. Parâmetros de desempenho do método.....	45
II.3. Resultados e discussão.....	47
II.3.1. Análise microbiológica dos produtos alimentares .....	47
II.3.1.1. Série A .....	47
II.3.1.2. Série B .....	50
II.3.1.3. Série C .....	52
II.3.1.4. Série D.....	54
II.3.1.5. Série E .....	58
II.3.2. Controlos bacteriológicos .....	60
II.3.3. Parâmetros de desempenho do método.....	62
<b>III – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....</b>	<b>65</b>
III.1. Introdução.....	66
III.1.1. Caracterização de <i>Salmonella</i> spp. ....	66

III.1.1.1. Caracterização bioquímica .....	66
III.1.1.2. Caracterização sorológica .....	66
III.1.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência .....	67
III.1.2. Reservatórios .....	67
III.1.3. Ambientes de processamento .....	68
III.1.4. Presença nos alimentos .....	68
III.1.5. Salmonelose .....	70
III.1.5.1. Etiologia .....	70
III.1.5.2. Mecanismos de patogenezidade .....	71
III.1.5.3. Epidemiologia .....	72
III.2. Material e métodos .....	75
III.2.1. Meios de cultura .....	75
III.2.2. Amostras .....	75
III.2.3. Preparação das amostras .....	76
III.2.4. Preparação da suspensão inicial .....	76
III.2.5. Contaminação artificial das amostras .....	77
III.2.6. Controlos bacteriológicos .....	77
III.2.6.1. Controlo de crescimento positivo .....	77
III.2.6.2. Controlo de crescimento negativo .....	77
III.2.6.3. Branco .....	77
III.2.6.4. Controlo de especificidade .....	78
III.2.7. Detecção de <i>Salmonella</i> spp. ....	78
III.2.7.1. Método de referência .....	78
III.2.7.2. Método alternativo .....	80
III.2.8. Parâmetros de desempenho do método .....	81
III.3. Resultados e discussão .....	82

III.3.1. Análise microbiológica dos produtos alimentares.....	82
III.3.1.1. Série A .....	82
III.3.1.2. Série B.....	84
III.3.1.3. Série C.....	87
III.3.1.4. Série D .....	89
III.3.1.5. Série E .....	91
III.3.2. Controlos bacteriológicos .....	93
III.3.3. Parâmetros de desempenho do método .....	96
<b>IV – Considerações finais .....</b>	<b>99</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>103</b>
<b>Apêndice I .....</b>	<b>112</b>
<b>Apêndice II .....</b>	<b>114</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Equipamento <i>mini</i> VIDAS com as duas secções, A e B, que o compõem .....	18
<b>Figura 2</b> - Módulo analítico do equipamento <i>mini</i> VIDAS .....	19
<b>Figura 3</b> – Exemplo de uma barrete simples de reagentes .....	21
<b>Figura 4</b> – Exemplo de uma etiqueta e autocolante colorido da barrete simples de reagentes ...	21
<b>Figura 5</b> - Barrete simples de reagentes e cone tipo identificados com o autocolante colorido .	22
<b>Figura 6</b> – Exemplo de um cartão <i>MLE</i> presente em cada embalagem de reagentes .....	24
<b>Figura 7</b> - Fórmula utilizada para o cálculo de VT .....	25
<b>Figura 8</b> - Funcionamento do sistema VIDAS .....	25
<b>Figura 9</b> - Detecção dos antígenos através do sistema VIDAS.....	26
<b>Figura 10</b> - Equipamento VIDAS <i>Heat &amp; Go</i> .....	27
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática dos métodos ISO 11290-1 e VIDAS LMO2 e número de dias necessários à sua realização .....	43
<b>Figura 12</b> – Presença de hemólise em meio <i>COS</i> .....	49
<b>Figura 13</b> – Meio sólido selectivo <i>Oxford</i> .....	50
<b>Figura 14</b> – Placa de <i>OAA</i> com presença de colónias típicas e atípicas de <i>L. monocytogenes</i> ...	57
<b>Figura 15</b> - Representação esquemática dos métodos ISO 6579:2002 e VIDAS <i>Easy SLM</i> e número de dias necessários à sua realização .....	79

<b>Figura 16</b> – Placa de <i>SM2</i> inoculada com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	86
<b>Figura 17</b> – Placa de <i>XLD</i> inoculada com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	87
<b>Figura 18</b> – Meio sólido selectivo <i>XLD</i> .....	95
<b>Figura 19</b> – Placa de <i>SM2</i> inoculada com <i>Escherichia coli</i> .....	95
<b>Figura 20</b> – Exemplo de uma galeria API <i>Listeria</i> .....	113
<b>Figura 21</b> – Exemplo de uma galeria API 20 E .....	115

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Algumas reacções bioquímicas das espécies do género <i>Listeria</i> .....	30
<b>Tabela 2</b> – Incidência de <i>Listeria monocytogenes</i> em diferentes matrizes alimentares .....	34
<b>Tabela 3</b> – Alimentos associados a surtos de listeriose humana .....	36
<b>Tabela 4</b> - Produtos alimentares analisados e agrupados por categoria alimentar .....	40
<b>Tabela 5</b> - Produtos alimentares analisados, agrupados por série de análise e correspondente número de amostra .....	40
<b>Tabela 6</b> - Composição da barrete de reagentes do teste VIDAS <sup>®</sup> LMO2.....	44
<b>Tabela 7</b> - Limiar e interpretação de VT para o teste VIDAS <sup>®</sup> LMO2 .....	45
<b>Tabela 8</b> – Fórmulas utilizadas no cálculo da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa .....	46
<b>Tabela 9</b> – Resultados obtidos através do método de referência na série A .....	48
<b>Tabela 10</b> - Resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2 na série A .....	49
<b>Tabela 11</b> - Resultados obtidos através do método de referência na série B .....	51
<b>Tabela 12</b> - Resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2 na série B.....	52
<b>Tabela 13</b> - Resultados obtidos através do método de referência na série C .....	53
<b>Tabela 14</b> - Resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2 na série C.....	54
<b>Tabela 15</b> - Resultados obtidos através do método de referência na série D .....	55

<b>Tabela 16</b> - Resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2 na série D .....	56
<b>Tabela 17</b> - Resultados obtidos através do método de referência na série E.....	58
<b>Tabela 18</b> - Resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2 na série E.....	59
<b>Tabela 19</b> - Resultados obtidos através do método de referência para os controlos das séries A a E .....	61
<b>Tabela 20</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 para os controlos das séries A a E.....	62
<b>Tabela 21</b> – Resultados finais obtidos por ambos os métodos na pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	63
<b>Tabela 22</b> – Resultados emparelhados de ambos os métodos .....	63
<b>Tabela 23</b> – Resultados da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa e sua fórmula de cálculo .....	64
<b>Tabela 24</b> – Subespécies e número de sorovares do género <i>Salmonella</i> .....	67
<b>Tabela 25</b> – Dose infectante de algumas sorovares de <i>Salmonella</i> em alguns produtos .....	70
<b>Tabela 26</b> – Número de casos de febre tifóide, paratifoide e outras salmoneloses no período de 2004 a 2008 em Portugal .....	72
<b>Tabela 27</b> – Número de casos de febre tifóide e paratifoide por faixa etária e género no período de 2004 a 2008 em Portugal .....	73
<b>Tabela 28</b> – Número de casos de outras salmoneloses por faixa etária e género no período de .....	
<b>Tabela 29</b> – Produtos alimentares analisados, agrupados por série de análise e correspondente número de amostra .....	76

<b>Tabela 30</b> – Composição da barrete de reagentes do teste VIDAS® SLM .....	80
<b>Tabela 31</b> – Limiar e interpretação de VT para o teste VIDAS® SLM .....	81
<b>Tabela 32</b> – Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série A .....	83
<b>Tabela 33</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM na série A .....	84
<b>Tabela 34</b> - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série B.....	85
<b>Tabela 35</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM na série B.....	86
<b>Tabela 36</b> - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série C .....	88
<b>Tabela 37</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM na série C .....	89
<b>Tabela 38</b> - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série D .....	90
<b>Tabela 39</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM na série D.....	91
<b>Tabela 40</b> - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série E.....	92
<b>Tabela 41</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM na série E.....	93
<b>Tabela 42</b> - Resultados obtidos através do método de referência para os controlos das séries A a E .....	94
<b>Tabela 43</b> - Resultados obtidos através do método VIDAS <i>Easy</i> SLM para os controlos das séries A a E.....	96
<b>Tabela 44</b> – Resultados finais obtidos por ambos os métodos na pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	97
<b>Tabela 45</b> – Resultados emparelhados de ambos os métodos .....	97

<b>Tabela 46</b> – Resultados da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa do protocolo VIDAS <i>Easy</i> SLM e sua fórmula de cálculo .....	98
<b>Tabela 47</b> – Composição da galeria API <i>Listeria</i> e leitura dos resultados .....	113
<b>Tabela 48</b> – Composição da galeria API 20 E e leitura dos resultados .....	116

# Preâmbulo

As doenças de origem alimentar são causa de mortalidade e morbidade todos os anos em todo o mundo (WHO, 2002). Uma detecção rápida, económica e automatizada dos microrganismos patogénicos, em toda a cadeia alimentar, constitui a maior preocupação da indústria alimentar e das autoridades de saúde pública (Malorny *et al.*, 2004).

Os alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* são uma fonte significativa de doenças e mortes em todo o mundo ([www.who.int/en](http://www.who.int/en)) e a salmonelose constitui uma das principais doenças de origem alimentar (Lee *et al.*, 2009). Assim, é de extrema importância a rápida e eficaz monitorização da presença destas duas bactérias nos produtos alimentares, principalmente nos mais susceptíveis. A ausência de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. em 25 g do género alimentício está definida nos critérios de segurança dos géneros alimentícios do Regulamento (CE) n.º 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamentos N.º 1441/2007 e N.º 365/2010.

A presença de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. pode ser detectada através de métodos de referência ou através de métodos alternativos, como por exemplo, métodos imunológicos. Os métodos de referência para a detecção destes microrganismos são dispendiosos e demorados, envolvendo etapas de enriquecimento, seguidas da cultura em meios sólidos selectivos e uma série de testes bioquímicos para confirmação. Adicionalmente aos testes bioquímicos, na detecção de *Salmonella* spp. o método de referência envolve também testes para confirmação sorológica (ISO 11290-1:1996; ISO 6579:2002). Hoje em dia estão comercialmente disponíveis diversos kits de diagnóstico baseados na técnica *ELFA* (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) que podem contribuir para acelerar e simplificar a detecção destes dois agentes epidemiológicos. Os testes VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II e VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella*, comercializados pela bioMérieux<sup>®</sup> SA, são testes qualitativos automatizados, efectuados nos equipamentos VIDAS<sup>®</sup>. Estes testes permitem a detecção pela técnica *ELFA* de antígenos de, respectivamente, *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* nos produtos alimentares e nas amostras ambientais (bioMérieux, 2008; bioMérieux, 2009). Os referidos testes estão incorporados, respectivamente, nos protocolos VIDAS LMO2 e VIDAS Easy SLM propostos pela bioMérieux. Estes dois protocolos encontram-se validados pela AFNOR como métodos alternativos de análise, para todos os produtos alimentares destinados ao consumo humano e para todas as amostras ambientais, em relação ao método de referência ISO 11290-1:1996, incluindo a ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, e ISO 6579:2002 respectivamente.

Apesar destes protocolos já se encontrarem validados pelo fabricante em relação aos referenciais normativos ISO (VIDAS LMO2 - certificado AFNOR BIO-12/11-03/04 e VIDAS *Easy SLM* - certificado AFNOR BIO-12/1-04/94 e BIO- 12/10-09/02), não invalida por parte do laboratório que os executa, de efectuar uma avaliação interna do desempenho das duas técnicas.

O presente estudo incide na comparação dos protocolos VIDAS LMO2 e VIDAS *Easy SLM* em relação aos procedimentos descritos nas normas internacionais ISO 11290-1:1996 incluindo a ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 e ISO 6579:2002, respectivamente. O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com o protocolo descrito na ISO 16140:2003.

---

---

# **I**

## **Introdução Geral**

---

---

## I.1. ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS

“A acreditação do laboratório consiste no reconhecimento da sua competência técnica para a execução de determinadas calibrações, ensaios e exames laboratoriais” (IPAC, 2005). Cabe ao laboratório definir qual o âmbito de actividade para o qual pretende a acreditação, podendo incluir todas as fases do processo de ensaio/calibração/análise ou apenas uma parte (IPAC, 2005).

A acreditação é concedida pelo organismo nacional de acreditação, que em Portugal é o IPAC (Instituto Português de Acreditação). Conforme estabelecido no Decreto-lei nº 125/2004, de 31 de Maio, o IPAC sucede ao IPQ (Instituto Português da Qualidade), que desde 1986 desempenhava esta função (IPAC, 2007).

O sistema de acreditação do IPAC está disponível, de uma forma imparcial e não discriminatória, a qualquer entidade, independentemente da sua natureza (pública ou privada), dimensão ou actividade, desde que sejam cumpridos os critérios de acreditação correspondentes. Embora o IPAC adopte os critérios estabelecidos em normas internacionais, pode também recorrer a outros documentos como guias interpretativos. Nomeadamente documentos produzidos no seio da *EA (European Cooperation for Accreditation)*, *ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation)* e *IAF (International Accreditation Forum)* (IPAC, 2007).

Os critérios de acreditação dizem respeito aos requisitos que os laboratórios devem cumprir e incluem requisitos de carácter geral (aplicáveis a todas as acreditações) e requisitos de carácter específico (conforme cada tipo de acreditação). Os requisitos gerais encontram-se definidos no Regulamento Geral de Acreditação (DRC001) e os critérios específicos dependem do tipo de laboratório. Para laboratórios de ensaio e calibração devem ser cumpridos os requisitos descritos no referencial normativo NP EN ISO / IEC 17025 (2005) e no seu guia interpretativo OGC001/2010 (IPAC, 2005).

O processo de acreditação engloba uma fase de candidatura e registo, uma fase de análise e avaliação e uma fase de decisão. Após ser concedida a acreditação (por 3 anos), o processo continua com uma fase de manutenção que inclui acções de acompanhamento (pelo menos 1 vez em 12 meses) e renovação (de 3 em 3 anos). A entidade que já se encontre acreditada pode em qualquer altura solicitar a extensão, redução, suspensão ou anulação do seu âmbito de acreditação (IPAC, 2007).

A acreditação traz diversas vantagens para a entidade acreditada, como por exemplo (IPAC, 2007):

- Proporciona o reconhecimento da qualidade e da competência do laboratório perante potenciais clientes;
- Proporciona a possibilidade de vender um serviço reconhecido nacional e internacionalmente;
- É um meio de consciencialização sobre a necessidade de melhoria contínua;
- Satisfaz as exigências do cliente, dando garantias de imparcialidade e respeito pela confidencialidade dos resultados e garantindo uma assistência permanente e o tratamento efectivo de eventuais reclamações.

## **I.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **I.2.1. Conceito de validação**

A validação de métodos corresponde a um requisito técnico da NP EN ISO / IEC 17025, de acordo com a qual “a validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objectiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos”. Isto é, o principal objectivo da validação é demonstrar, por meio de estudos experimentais, que o método é adequado à utilização pretendida e que os resultados daí obtidos são correctos e fiáveis (Eurachem, 2002).

### **I.2.2. Âmbito de aplicação**

O laboratório é responsável pela validação do método e qualquer método analítico pode ser validado, como por exemplo métodos internos (concebido ou desenvolvido pelo próprio laboratório) e métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto (NP EN ISO/IEC 17025, 2005).

Deve-se proceder à validação de um método analítico quando se pretende verificar a sua adequabilidade ao fim pretendido, como por exemplo (Eurachem, 1998):

- Desenvolvimento de um novo método;
- Quando há alterações num determinado método de forma a melhorar o mesmo ou para ampliar o seu âmbito de aplicação;
- Quando o Controlo de Qualidade indicar que o método se alterou com o tempo;
- Quando o método é utilizado em laboratórios diferentes com diferentes equipamentos;
- Demonstrar a equivalência entre dois métodos (um novo método e a norma).

### **I.2.3. Importância da validação de métodos**

Diariamente são realizadas, por todo o mundo, milhares de análises microbiológicas de alimentos e águas. Os laboratórios das unidades de produção efectuam o controlo da qualidade microbiológica das matérias-primas, os efeitos dos processos de tratamento e a qualidade dos produtos finais. Os laboratórios públicos, ou prestadores de serviços privados, monitorizam a qualidade dos géneros alimentícios e podem estar também envolvidos na investigação da ocorrência de doenças de origem alimentar e na reclamação de clientes (Lightfoot e Maier, 2003).

Muitas decisões são tomadas com base nos resultados analíticos e, deste modo, a ocorrência de resultados incorrectos pode ter um forte impacto na economia e/ou na saúde pública. Por exemplo, a ocorrência de resultados falsos positivos pode conduzir à rejeição desnecessária de lotes de produtos alimentares e ao alarme e inquietação inútil do público, lesando a reputação do fabricante, com consequente perda de clientes. Por outro lado, os resultados falsos negativos podem comprometer a saúde pública expondo a população a produtos alimentares contaminados (Lightfoot e Maier, 2003).

Nesta perspectiva a validação de métodos analíticos é uma condição importante nas análises microbiológicas de forma a proporcionar confiança nos resultados obtidos pelo método.

### **I.2.4. Ferramentas utilizadas na validação de métodos analíticos**

Na validação de métodos existe um conjunto de ferramentas que fornecem a rastreabilidade necessária às avaliações em curso. Nomeadamente a utilização de brancos, materiais de referência e o recurso a réplicas (Eurachem, 1998).

A utilização de brancos permite avaliar o quanto o resultado obtido na análise depende apenas da contaminação e das características do produto analisado e não de outras causas (Eurachem, 1998). Ou seja, são utilizados para avaliar a esterilidade das condições de trabalho durante o processo analítico, garantindo que todos os aspectos da análise estão sob controlo (Lightfoot e Maier, 2003).

Os materiais de referência são ferramentas muito importantes na avaliação da qualidade dos resultados obtidos, sendo também utilizados para fins de calibração (Eurachem, EEE/RM/062rev3). São materiais com níveis de contaminação conhecidos (Lightfoot e Maier, 2003), como por exemplo culturas bacteriológicas de referência de colecções conhecidas, como a *ATCC* (*American Type Culture Collection*) e a *NCTC* (*National Collection of Type Cultures*).

As réplicas podem ser utilizadas, pelo analista, como uma forma de autocontrolo. A análise da variação de contagens em duplicado fornece informações valiosas para o controlo de qualidade. Uma grande variação entre as contagens das diferentes placas sugere a existência de alguns problemas como por exemplo: contaminação, negligência do analista ou medições imprecisas de volumes. Por razões de ordem económica o número de placas utilizadas em paralelo não vai além de duas ou três (Lightfoot e Maier, 2003).

### **I.2.5. Protocolo de validação**

A validação de métodos microbiológicos deve reflectir as condições reais de trabalho, as quais podem ser alcançadas através da utilização de alimentos natural ou artificialmente contaminados. Preferencialmente devem ser utilizados os primeiros, contudo a inoculação artificial é, frequentemente, a única solução disponível. O analista tem de estar inteiramente ciente de que a adição de microrganismos contaminantes a uma matriz não corresponde de forma igual à presença dos contaminantes de ocorrência natural, ela apenas simula, de forma superficial, esta presença (Eurachem, 2002; RELACRE, 2007).

De acordo com a norma ISO 16140:2003, a validação de métodos analíticos é composta por duas etapas que podem ser realizadas em simultâneo: (1) estudo de comparação de métodos, realizado pelo laboratório organizador entre o método alternativo (método em análise, para o qual se pretende a validação) e o método de referência e (2) estudo interlaboratorial de cada um dos métodos, que consiste num estudo de desempenho do método, através da utilização de amostras comuns em vários laboratórios e sob o controlo do laboratório organizador.

### **I.2.6. Parâmetros de desempenho do método**

Consoante os objectivos da aplicação do método, o laboratório deve decidir quais os parâmetros de desempenho que devem ser avaliados. Como a validação é um processo que custa tempo e dinheiro esta pode ter de ser, inevitavelmente, restringida por estes mesmos motivos. O laboratório, quando efectuar a validação de um método analítico, deve ter em consideração as restrições impostas, as necessidades dos clientes e a experiência que tem do próprio método (RELACRE, 2007).

Os métodos a validar podem ser qualitativos (cuja resposta é a presença ou ausência do microrganismo alvo numa determinada quantidade de amostra) ou quantitativos (cuja resposta é a quantidade do microrganismo alvo medida numa determinada quantidade de amostra) (ISO 16140:2003).

### **I.2.6.1. Métodos qualitativos**

Para métodos qualitativos, de acordo com a ISO 16140:2003, devem ser determinados, se apropriado, os seguintes parâmetros: exactidão relativa, sensibilidade relativa, especificidade relativa, desvio positivo, desvio negativo, nível de detecção relativo, inclusividade e exclusividade.

A exactidão relativa é o grau de correspondência entre os resultados obtidos pelo método de referência e os resultados obtidos pelo método alternativo para amostras idênticas (ISO 16140:2003). A sensibilidade relativa é a capacidade do método alternativo em detectar o microrganismo alvo quando o mesmo é detectado pelo método de referência (ISO 16140:2003) e a especificidade relativa corresponde à capacidade do método alternativo em detectar apenas o microrganismo alvo na presença de outros componentes (EURACHEM, 1998).

O desvio positivo ocorre quando o método alternativo fornece um resultado positivo e o método de referência fornece um resultado negativo. Verifica-se um desvio negativo quando ocorre o oposto, ou seja, quando o método alternativo fornece um resultado negativo e o método de referência um resultado positivo (ISO 16140:2003).

O nível de detecção relativa corresponde ao menor número de microrganismos cultiváveis que pode ser detectado na amostra em 50 % das ocasiões pelo método alternativo e pelo método de referência (ISO 16140:2003). A inclusividade é a capacidade do método alternativo em detectar o microrganismo alvo dentro de uma grande variedade de estirpes e a exclusividade é a ausência de interferência de um conjunto de microrganismos não alvo relevantes do método alternativo (ISO 16140:2003).

### **I.2.6.2. Métodos quantitativos**

Segundo a ISO 16140:2003 devem ser calculados, para métodos quantitativos os seguintes parâmetros: linearidade, exactidão relativa, limites de detecção e quantificação, sensibilidade relativa, especificidade, inclusividade, exclusividade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade. Uma vez que este estudo incidiu na validação de métodos qualitativos, não serão desenvolvidos os referidos conceitos.

### **I.3. CONDIÇÕES DE ENSAIO**

A validação de um método analítico deve ser realizada em cumprimento das boas práticas laboratoriais, de modo a evitar interferências na qualidade dos resultados. É importante garantir que apenas os microrganismos presentes na amostra são isolados e enumerados (ISO 7218:2007). De modo a satisfazer estas condições, é necessário que os ensaios sejam conduzidos da forma mais cuidada possível e que todos os materiais e equipamentos necessários estejam de acordo com os requisitos descritos nas normas ou nos procedimentos aplicáveis.

#### **I.3.1. Pessoal**

A realização das análises microbiológicas deve ser efectuada, ou supervisionada, por pessoal experiente. Para a produção de resultados com qualidade, é importante, que todo o pessoal envolvido tenha conhecimento das suas funções e da importância das suas tarefas na obtenção desses mesmos resultados. O laboratório deve assegurar que todo o pessoal recebe formação e treino adequado ao desempenho competente dos ensaios e à utilização correcta dos equipamentos (Lightfoot e Maier, 2003; RELACRE, 2007). A competência do pessoal técnico deve ser avaliada regularmente, por exemplo, através da participação em ensaios de intercomparação externa e/ou interna, ou da utilização de materiais de referência (ISO 7218:2007).

A protecção do pessoal é também muito importante. Deve-se evitar a contaminação das amostras pelo analista e também para protecção da sua saúde durante a manipulação de materiais potencialmente contaminados (ISO 7218:2007).

#### **I.3.2. Ambiente**

Para a produção de resultados fiáveis, a concepção das instalações deve ser adequada pois as condições ambientais (biocontaminação, temperatura, luz, poeiras, espaços de armazenagem) podem influenciar a resposta da equipa e o funcionamento dos equipamentos delicados (Lightfoot e Maier, 2003; ISO 7218:2007; RELACRE, 2007).

O laboratório deve estar projectado de modo a minimizar os riscos de contaminação cruzada, definindo as diferentes áreas do laboratório de acordo com o princípio de “marcha em frente” ou quando tal não é possível, dado as limitações estruturais das salas, efectuar a gestão das actividades em termos de tempo e de espaço. O laboratório deve evidenciar de que é capaz

de controlar os riscos daí resultantes e de que dispõe de meios efectivos para os ultrapassar, como por exemplo, um programa de limpeza e de monitorização da biocontaminação e desinfecção das salas e superfícies de trabalho (Lightfoot e Maier, 2003; ISO 7218:2007; RELACRE, 2007).

### **I.3.3. Equipamento**

Para a execução dos ensaios, os equipamentos utilizados têm de funcionar correctamente e, quando aplicável, têm de estar devidamente calibrados ou validados nos parâmetros pretendidos para o seu correcto desempenho. A frequência de calibração e verificação deve ser determinado por cada laboratório, dependendo do tipo de equipamento e do nível de actividade do laboratório (ISO 7218:2007).

Os equipamentos devem encontrar-se em perfeitas condições, pois mesmo o pessoal mais qualificado não poderá produzir resultados fiáveis se os equipamentos disponíveis não forem adequados ou se não cumprirem os parâmetros de desempenho afectos ao ensaio (Lightfoot e Maier, 2003; RELACRE 2007).

Todos os equipamentos/dispositivos de medição e ensaio devem ser avaliados quanto ao seu desempenho e devem ser mantidos os respectivos registos (calibração, manutenção, reparações) (ISO 7218:2007).

### **I.3.4. Material**

De acordo com a Norma Portuguesa nº2079 de 1989, o material existente num laboratório de microbiologia pode ser dividido em material contaminado, material sujo não contaminado, material limpo e material esterilizado. O material deve ser manuseado e armazenado de acordo com as suas características.

A correcta identificação da amostra é crucial de modo a evitar trocas, devendo todo o material de análise numa amostra ser marcado com o número de registo da amostra, a temperatura de incubação, o meio de cultura utilizado e a data de realização. Quando relevante deve ainda incluir a identificação do técnico (mesma amostra processada por vários técnicos em simultâneo). O material das subsequentes operações de caracterização, proveniente da primeira incubação, deve de igual modo ser marcado com o mesmo número de registo da amostra e o meio de cultura proveniente (NP nº2079 de 1989).

### **I.3.5. Preparação de meios de cultura**

A correcta preparação dos meios de cultura é um passo fundamental na análise microbiológica ao qual deve ser dada especial atenção.

Os meios de cultura podem ser comercialmente adquiridos prontos a usar, ou podem ser preparados no laboratório a partir de formulações comerciais desidratadas ou a partir de componentes individuais (ISO/TS 11133-1:2009).

Na preparação dos meios de cultura devem ser respeitadas as boas práticas laboratoriais e devem ser armazenados em condições adequadas de modo a prevenir a modificação da sua composição. A aquisição e/ou a preparação dos meios deve ser planeada de modo a serem utilizados dentro do prazo de validade e deve ser aplicada uma organização e utilização de acordo com a regra *first in - first out (FIFO)*. Devem ser seguidas com precisão as indicações do fabricante, no caso da preparação de meios a partir das formulações comerciais, ou as indicações normativas no caso da preparação a partir de componentes individuais (ISO/TS 11133-1:2009).

O controlo da água utilizada na preparação de meios de cultura e soluções deve ser rigoroso visto poder ser a maior causa de diferenças de resultados nos ensaios laboratoriais. A verificação regular da contaminação microbiológica deve ser estabelecida de acordo com a ISO 6222:1999 ou método equivalente (ISO/TS 11133-1:2009).

A adequabilidade do comportamento dos meios de cultura e diluentes preparadas no laboratório, deve ser avaliada no que diz respeito às propriedades físicas (ex: pH, volume, cor, consistência e humidade) e à contaminação microbiológica (esterilidade, produtividade, selectividade e especificidade), de acordo com o meio ou diluente utilizado (ISO 11133-2:2003).

## I.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS ALIMENTOS

### I.4.1. Microrganismos indicadores

Todos os alimentos, com exceção dos produtos esterilizados, contêm diversos microrganismos inócuos, como por exemplo leveduras e bactérias. Os alimentos tornam-se importantes veículos de transmissão de doenças quando são violados os princípios de higiene, limpeza e desinfecção, expondo os produtos a condições que permitem a contaminação e/ou a multiplicação de agentes infecciosos (ICMSF, 2000).

A presença de determinados grupos de microrganismos nos alimentos, fornece diversas informações relativas às condições de processamento e armazenamento dos mesmos, revelando se os produtos foram expostos a condições propícias à introdução e/ou multiplicação de agentes infecciosos. Estes grupos de microrganismos designam-se por microrganismos indicadores e permitem avaliar a qualidade e a segurança dos produtos alimentares, disponíveis para o consumidor (ICMSF, 2000).

A qualidade geral de um produto é avaliada através das contagens totais (aeróbios mesófilos, psicrotróficos e termófilos) e das contagens de bolores e leveduras. A qualidade higiênica é analisada com base nos coliformes totais (inclui *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.), coliformes termotolerantes (coliformes a 45 °C ou coliformes fecais), *Enterobacteriaceae* e enterococos intestinais. A segurança de um produto está relacionada com a sua inocuidade e é avaliada com base na presença de microrganismos patogênicos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (ICMSF, 2000).

### I.4.2. Métodos de referência

Os métodos de referência para a análise microbiológica dos alimentos envolvem diversas etapas exigentes. Além disso são métodos com uma grande despesa associada, não só aos consumíveis e à ocupação do equipamento, mas também ao nível do tempo gasto pelo preparador/analista, na sua execução e na preparação de meios de cultura.

Os produtos minimamente processados possuem uma vida de prateleira curta, limitando a utilização destes métodos na sua análise. Uma vez que a obtenção de resultados demora alguns dias o tempo do produto na prateleira fica limitado. De modo a facilitar e acelerar algumas etapas da análise pelos métodos de referência, surgiram diversas ferramentas laboratoriais

automatizadas. Por exemplo, uma boa homogeneização da mistura da amostra com um diluente ou meio de cultura líquido, pode ser obtida através de um homogeneizador peristáltico (Stomacher<sup>®</sup>) e as restantes diluições podem ser realizadas por um dispensador automático (*diluter*). A sementeira em placas pode também ser realizada utilizando sistemas automatizados que distribuem o inoculo para placas sobre uma plataforma rotativa (*spiral plater*) (Montville e Mathews, 2008).

A identificação do microrganismo desconhecido é efectuada com base nas suas características bioquímicas. Esta identificação é um processo longo e dispendioso existindo, actualmente, diversos *kits* que permitem uma identificação mais rápida e económica dos patogénicos (sistema de identificação API<sup>®</sup>, *bioMérieux*). No entanto, estes *kits* revelam-se métodos fastidiosos quando é necessário identificar um grande número de colónias (Doyle e Beuchat, 2007).

#### **I.4.2.1. Detecção de *Listeria monocytogenes***

O procedimento de referência para a detecção e quantificação de *Listeria monocytogenes*, em produtos destinados ao consumo humano e animal, encontra-se descrito na norma ISO 11290-1:1996 (incluindo a sua actualização ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004) e ISO 11290-2:1998, respectivamente. A detecção de *L. monocytogenes* através do método de referência é um procedimento que requer duas etapas de enriquecimento (primário e secundário) seguidas do isolamento em dois meios sólidos selectivos diferentes que permitem a visualização das colónias (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti – ALOA* e *Palcam* e/ou *Oxford*). As colónias presuntivas de *L. monocytogenes* são sujeitas a uma série de testes bioquímicos para a sua identificação (ISO 11290-1:1996, ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004).

#### **I.4.2.2. Detecção de *Salmonella* spp.**

O procedimento de referência para a detecção de *Salmonella* spp., em produtos destinados ao consumo humano e animal, encontra-se descrito na norma internacional ISO 6579:2002. A detecção de *Salmonella* spp. de acordo com o referido procedimento, envolve um pré-enriquecimento não selectivo para a revitalização das bactérias do género *Salmonella* (presentes em pequeno número e/ou fragilizadas pelos processos de produção e armazenamento). Após o pré-enriquecimento é efectuado um enriquecimento selectivo em dois meios de cultura líquidos para favorecer o crescimento das salmonelas presentes (*Rappaport-Vassiliadis medium with soya – RVS* e *Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth – MKTTn*). É depois realizada uma

cultura em dois meios sólidos selectivos (*Xylose Lysine deoxycholate agar – XLD* e por exemplo, *Brilliant green agar – BGA* ou *chromID<sup>TM</sup> Salmonella - SM2*) que permitem a visualização das colónias. As colónias presuntivas de *Salmonella* são depois sujeitas a testes bioquímicos e sorológicos para a sua identificação (ICMSF, 2000; ISO 6579:2002).

### **I.4.3. Métodos Alternativos**

O desenvolvimento de novos métodos, mais rápidos que os métodos de referência, está em constante crescimento e tem acompanhado, paralelamente, a incidência de surtos de doenças de origem alimentar. Por exemplo, são cada vez mais comuns os ensaios para a detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Campylobacter*, importantes microrganismos patogénicos de grande impacto ao nível da saúde pública. É de referir a introdução de ensaios para *Enterobacter sakazakii*, um patogénico emergente implicado em meningite infantil e associado a formulações para lactentes (Doyle e Beuchat, 2007).

Estes métodos alternativos, que declaram maior rapidez, simplicidade e facilidade de execução, podem ser classificados em 4 grupos diferentes com base na sua tecnologia: métodos físicos, químicos, moleculares e imunológicos (Jay, 2006).

#### **I.4.3.1. Métodos físicos**

Os métodos físicos baseiam-se na contagem do número de células presentes numa alíquota da amostra. A contagem pode ser realizada através de um contador electrónico (*COULTER counter*), que tem por base a avaliação da resistência das células presentes. Outros exemplos de métodos físicos são a microcalorimetria, a impedância/condutância (*Bactometer, bioMérieux*) e a citometria de fluxo (Jay, 2006).

#### **I.4.3.2. Métodos químicos**

Os grandes avanços conseguidos no desenvolvimento de métodos dentro deste grupo centram-se na utilização de substratos cromogénicos e fluorogénicos e na utilização de ATP (adenosina-trifosfato) (Doyle e Beuchat, 2007).

Recentemente os meios cromogénicos têm sido introduzidos na identificação de microrganismos patogénicos, nomeadamente de *Listeria* spp. (*ALOA*) e *Salmonella* spp. (*SM ID2, bioMérieux*) (Doyle e Beuchat, 2007). Os meios cromogénicos possuem substratos na sua composição que permitem a revelação de actividades enzimáticas correspondentes a

determinados microrganismos, através do aparecimento de uma coloração no meio (*bioMérieux*, 2009).

A técnica de bioluminescência é de particular importância uma vez que não requer um enriquecimento da cultura e fornece uma rápida estimativa da qualidade dos alimentos e das superfícies analisadas. Esta técnica utiliza a enzima luciferase para medir a presença de ATP presente em todas as células vivas (*Lightning bioluminescence system, Hi-Lyte*). No entanto, a utilização deste tipo de técnicas oferece resultados indirectos da presença das populações microbianas, estando mais vocacionados para o controlo da eficácia de higienização (Doyle e Beuchat, 2007).

#### **I.4.3.3. Métodos moleculares**

Os métodos moleculares baseiam-se na informação genética das células (ácido desoxirribonucleico - DNA) para diferenciação e identificação dos microrganismos patogénicos. Incluem, entre outros, os métodos *PCR* (*polymerase chain reaction*), *pulsed-field gel electrophoresis*, ribotipagem (Doyle e Beuchat, 2007).

O *PCR* é talvez o método mais aplicado. Baseia-se na utilização de enzimas para amplificar um segmento específico do DNA e constitui um método altamente sensível que consegue amplificar, em poucas horas,  $10^6$  vezes o segmento de DNA. Existem actualmente algumas alternativas ao *PCR* convencional, como por exemplo o *PCR* de tempo real, com mais vantagens de aplicação à análise microbiológica de alimentos (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

#### **I.4.3.4. Métodos imunológicos**

Os métodos imunológicos são, de entre todos os métodos alternativos, os mais utilizados para a avaliação da inocuidade dos alimentos. Os métodos imunológicos permitem a identificação de bactérias patogénicas específicas, associadas a uma grande variedade de matrizes alimentares. Estes métodos baseiam-se na formação de um complexo antigénio-anticorpo e distinguem-se cinco técnicas diferentes baseados nesta reacção (Doyle e Beuchat, 2007): *Latex Agglutination (LA)* e *Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA)*, *Gel Immunodiffusion*, *Immunomagnetic Separation*, *Immunoprecipitation* e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*.

A técnica de *Latex Agglutination* utiliza esferas de látex revestidas com anticorpos que formam uma reacção de aglutinação visível na presença de um antigénio específico do

microrganismo alvo. *Reverse Passive Latex Agglutination* difere de *LA* pelo facto de os antígenos serem solúveis e em vez de aglutinarem, formam uma camada com o anticorpo (Doyle e Beuchat, 2007).

A técnica de *Gel Immunodiffusion* consiste num ensaio que é apenas utilizado no teste *Salmonella* 1-2, um dos primeiros métodos rápidos na análise microbiológica dos alimentos. É baseado na imunodifusão (deslocação das proteínas através do agar) e na formação do complexo antígeno-anticorpo que forma um precipitado visível numa câmara. Os anticorpos são específicos para *Salmonella* flagelar e, portanto, não detecta as variantes não flagelares (Doyle e Beuchat, 2007).

A técnica de *Immunomagnetic Separation* foi concebida para separar o microrganismo alvo da amostra. Os anticorpos estão acoplados a esferas magnéticas que, quando adicionadas à amostra, facilitam a adesão das células alvo isolando o complexo. As esferas podem ser depois inoculadas em meio líquido, ser colocadas em meio sólido selectivo ou ser directamente utilizadas em *PCR* (Doyle e Beuchat, 2007).

Na técnica de *Immunoprecipitation* a detecção dos antígenos é realizada através de esferas coloridas de látex revestidas com os anticorpos, também conhecido como *immunochromatography* (Doyle e Beuchat, 2007).

Os testes *ELISA* baseiam-se na formação de um complexo (*sandwich*) constituído por anticorpo-antígeno-conjugado. A detecção dos antígenos presentes numa cultura de enriquecimento é feita através de anticorpos revestidos numa matriz sólida e através da adição de um segundo anticorpo que se encontra conjugado com uma enzima. Um substrato é depois adicionado e é alterado pela enzima produzindo um produto colorido que pode ser lido visualmente ou através de um espectrofotómetro. Existem diversas variações do formato *ELISA* que incluem modificações ao nível do sinal como por exemplo *enzyme-linked coagulation assays* e *enzyme-linked fluorescence assays (ELFA)* (Doyle e Beuchat, 2007).

O *VIDAS (bioMérieux)* é um exemplo de um equipamento que permite a realização de testes baseados na técnica *ELFA*, para a detecção de diversos microrganismos patogénicos nos alimentos, nomeadamente *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. .

#### **I.4.4. Limitações da análise microbiológica dos alimentos**

##### **I.4.4.1. Matriz**

Os alimentos são matrizes complexas (lípidos, glúcidos, proteínas, conservantes e outros compostos químicos) e variam quanto à sua natureza física (líquidos, sólidos, secos, semi-

sólidos). Estas características podem dificultar a sua análise, destacando-se também o facto de os microrganismos patogénicos se encontrarem, muitas vezes, presentes em níveis baixos e com uma distribuição heterogénea nos alimentos. Esta distribuição dificulta a obtenção de uma amostra estatisticamente representativa (ICMSF, 2000; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

#### **I.4.4.2. Duração do ensaio**

O termo *métodos rápidos* muitas vezes utilizado para designar métodos alternativos aos métodos de referência, pode implicar segundos, minutos, horas ou até dias. Quando se considera a rapidez de um método deve-se ter em conta todas as etapas do seu procedimento e não apenas o tempo do teste em si. Um teste pode demorar apenas alguns minutos, no entanto a amostra pode necessitar de etapas de enriquecimento prévias à realização do teste, a fim de recuperar as células fragilizadas presentes na alíquota da amostra. A obtenção de um resultado instantâneo seria o ideal, contudo tal não foi ainda alcançado. Os métodos rápidos são por diversas vezes incorporados em protocolos (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

#### **I.4.4.3. Sensibilidade do método**

A sensibilidade do método é um aspecto muito importante uma vez que define a capacidade do mesmo em detectar baixos níveis de contaminação do microrganismo alvo na alíquota da amostra. Geralmente os testes rápidos possuem um nível de detecção de  $10^2$  a  $10^5$  UFC (unidades formadoras de colónias) / g ou  $10^2$  a  $10^5$  UFC / ml (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

#### **I.4.4.4. Células fragilizadas**

A fragilidade dos microrganismos pode ocorrer devido a diversos factores de stress relacionados com o tipo de tratamento a que o alimento é submetido, tais como, calor, radiação, ácidos ou produtos de higienização. A fragilidade é influenciada pelo tempo, temperatura e concentração do agente de debilitação e pela estirpe do microrganismo alvo. A fragilidade é caracterizada como um aumento das necessidades nutricionais ou como uma diminuição da resistência das células aos agentes selectivos (Montville e Mathews, 2008).

A existência de células fragilizadas num produto é um ponto importante na segurança alimentar. Estas células podem não ser detectadas na análise após o processamento e podem

recuperar antes do consumo, representando deste modo um problema de segurança para a saúde do consumidor. A recuperação das células fragilizadas é influenciada por factores ambientais e requer um aumento da fase de latência do crescimento das mesmas. Por exemplo, células de *Listeria monocytogenes* que foram submetidas a 55 °C durante 20 minutos e que se encontram fragilizadas iniciam a sua recuperação imediatamente a 37 °C, estando totalmente recuperadas após 9 horas. A recuperação de células fragilizadas pela acção do calor, desta mesma bactéria, a 4 °C inicia-se após 8 a 10 dias, sendo a total recuperação alcançada ao fim de 16 a 19 dias (Montville e Mathews, 2008).

#### **I.4.4.5. Células viáveis mas não cultiváveis**

Outro aspecto importante a ter em conta nas análises microbiológicas é a presença de células VNC (viáveis mas não cultiváveis).

As células VNC representam um estado dormente (inactivo) e constituem uma estratégia de sobrevivência de muitas espécies não esporuladas, nomeadamente, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia* e *Shigella*. Durante a passagem para o estado VNC, as células adquirem uma estrutura morfológica diferente. As células em forma de bastonete diminuem até atingirem uma forma esférica, levando entre 2 dias a várias semanas até que uma população inteira de células vegetativas atinja o estado VNC. A viabilidade destas células pode ser demonstrada através de testes citológicos e através do seu metabolismo (Montville e Mathews, 2008).

Uma vez que o estado VNC é maioritariamente induzido pela limitação de nutrientes em ambientes aquáticos, poderia parecer irrelevante a sua presença nos alimentos. Contudo, alterações na concentração de sal, mudanças na temperatura e a exposição ao hipoclorito podem também induzir as células para um estado VNC. A recuperação das células VNC pode ser induzida através de alterações de temperatura ou através do retorno gradual de nutrientes e é demonstrada pelo aumento das células cultiváveis que, no entanto, não é acompanhada de um aumento no número total de células. Não é conhecido nenhum factor específico que possa evitar a recuperação das células do estado VNC (Montville e Mathews, 2008).

Todos estes aspectos, embora estejam a ser cada vez mais ultrapassados com o desenvolvimento de métodos mais rápidos e sensíveis, continuam a constituir um verdadeiro desafio para todos os ensaios e tecnologias.

## I.5. O EQUIPAMENTO *mini VIDAS*

### I.5.1. Geral

O equipamento VIDAS (*bioMérieux*) encontra-se disponível em dois modelos que apenas diferem na capacidade de amostras em análise: o VIDAS, que permite a análise simultânea de, no máximo, 30 amostras e o *mini VIDAS* (equipamento utilizado neste estudo), que possibilita a execução de até 12 amostras ao mesmo tempo, sendo todo o princípio de funcionamento, exactamente o mesmo (*bioMérieux*, 2008).

O *mini VIDAS* é um equipamento de pequenas dimensões (44 cm de altura, 54 cm de largura e 55 cm de profundidade) que efectua automaticamente todas as etapas dos testes de análise até à impressão do resultado (Figura 1). Este equipamento permite a execução de testes qualitativos (em barretes simples ou em barretes duplas de reagentes) e testes quantitativos (*bioMérieux*, 2005). Neste estudo foram efectuados apenas testes qualitativos em barretes simples de reagentes, pelo que apenas serão abordados os aspectos que dizem respeito a estes testes.

O equipamento é constituído por um módulo analítico, por um sistema óptico fluorimétrico, um sistema mecânico, um sistema de incubação, um processador central, um teclado, um monitor, uma impressora térmica e um leitor de código de barras (*bioMérieux*, 2005).



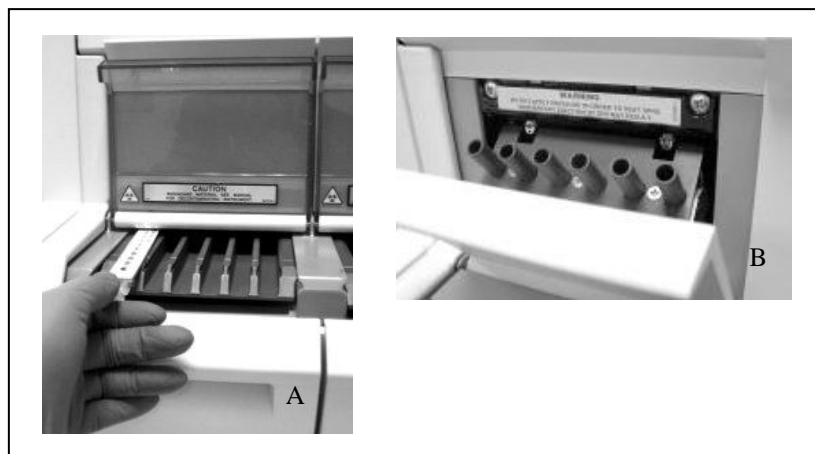
**Figura 1-** Equipamento *mini VIDAS* com as duas secções, A e B, que o compõem.

### I.5.2. Módulo analítico

As secções A e B, com seis posições cada, correspondem à parte analítica do equipamento e permitem testar até 12 barretes simples de reagentes. Estas duas secções funcionam independentemente uma da outra, permitindo ao equipamento gerir uma variedade de testes em simultâneo. Podem ser realizados testes diferentes nas duas secções e na mesma secção a realização simultânea de testes diferentes é possível desde que estes sejam compatíveis (a lista de compatibilidade de ensaios pode ser consultada no ecrã do próprio equipamento) (*bioMérieux*, 2005).

A parte superior de cada uma das secções é composta por um bloco de cones com 6 posições, às quais correspondem 6 posições do suporte de barretes, que constitui a parte inferior de cada secção (Figura 2). Durante a execução dos testes, o bloco de cones faz parte do sistema de pipetagem automático que utiliza os cones para misturar e transferir os reagentes (*bioMérieux*, 2005).

Para além de um processador central que controla o sistema na sua totalidade, cada uma das secções contém um microprocessador responsável pela execução completamente automatizada dos testes. Os testes correspondem a uma série de comandos que compreendem a aspiração dos reagentes, as etapas de lavagem e as leituras das ópticas (*bioMérieux*, 2005).



**Figura 2** - Módulo analítico do equipamento *mini VIDAS*: (A) suporte de barretes; (B) bloco de cones. Adaptado de *bioMérieux* (2005).

### **I.5.3. Sistema de detecção**

O sistema de detecção do *mini VIDAS* é composto por um leitor óptico fluorimétrico que se encontra instalado num sistema mecânico. Este permite a utilização do leitor óptico por ambas as secções deslocando-se ao longo do equipamento para ler o teste em questão. O sistema óptico detecta qualquer alteração química que intervenha na cuvete de leitura presente em cada uma das barretes de reagentes. O sistema óptico mede a concentração do produto reagente libertado durante a análise que emite um sinal de fluorescência proporcional à sua concentração (*bioMérieux, 2005*).

### **I.5.4. Controlo da temperatura**

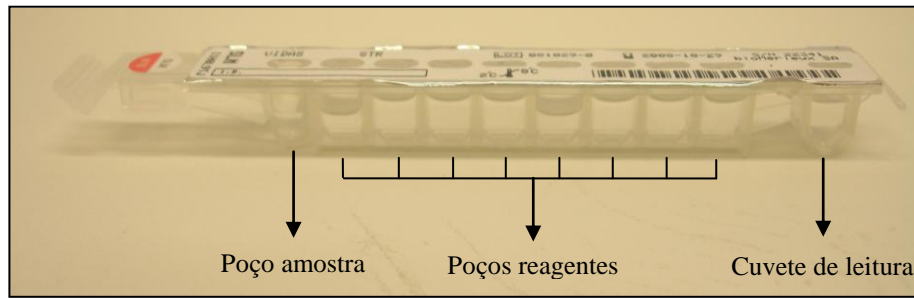
Todos os testes efectuados no *mini VIDAS* necessitam de um controlo de temperatura. Estão instalados dois sistemas de incubação, um no bloco de cones e outro no suporte de barretes. A temperatura absoluta é de 36 °C a 38 °C e de 35 °C a 38 °C, para o bloco de cones e para o suporte de barretes, respectivamente. A temperatura relativa entre as duas secções é de  $\pm 0,7$  °C e de  $\pm 1$  °C respectivamente. O controlo automático é realizado por sonda térmica.

### **I.5.5. Embalagem de reagentes**

Em cada embalagem de reagentes está presente o material necessário para um teste específico. Cada embalagem contém: barretes simples (ou duplas) de reagentes, cones (um para cada barrete simples e dois por barrete dupla de reagentes), dois controlos (positivo e negativo), o(s) calibrador(es), um folheto informativo e um cartão *MLE (Master Lot Entry)* (*bioMérieux, 2005*).

#### **I.5.5.1. Barretes simples de reagentes**

Cada barrete simples de reagentes (Figura 3) tem 157 mm de comprimento, 18 mm de largura e 15 mm de profundidade e é composta por 10 poços: o poço amostra (960  $\mu$ l), 8 poços reagentes (960  $\mu$ l) e o poço substrato (cuvete de leitura) (530  $\mu$ l) (*bioMérieux, 2005*).



**Figura 3-** Exemplo de uma barrete simples de reagentes.

O poço amostra destina-se a receber a amostra, devendo ser respeitado o volume indicado no folheto informativo de cada teste. Os oito poços intermédios contêm os reagentes necessários para cada reacção e o último poço constitui uma cuvette de leitura na qual é medida a fluorescência do substrato (*bioMérieux, 2005*).

Cada barrete tem uma etiqueta e um autocolante colorido (Figura 4). A etiqueta contém os dados relativos ao teste em questão: nome do teste (ou código do teste com 2 a 4 caracteres e/ou números), código do lote de fabrico, data de validade e um código de barras. Em condições normais, o leitor de código de barras interno lê o código de barras presente na barrete permitindo identificar o nome do teste, o código do lote de fabrico e a data de validade da embalagem de reagentes. O autocolante colorido da barrete corresponde a um autocolante similar no cone correspondente ao mesmo teste (*bioMérieux, 2005*).



**Figura 4** – Exemplo de uma etiqueta e autocolante colorido da barrete simples de reagentes.

A barrete encontra-se coberta com uma folha de alumínio que assegura a estanquicidade dos poços bem como a ausência de evaporação que poderiam comprometer a eficácia dos reagentes. O poço amostra apresenta uma parte perfurada para permitir a introdução da amostra e o poço substrato é composto por um plástico com as qualidades ópticas apropriadas.

### I.5.5.2. Cones

Os cones são elementos de plástico descartáveis especialmente concebidos para o sistema VIDAS. Existe um cone para cada barrete e ambos são identificados por autocolantes coloridos e por um código de teste idênticos (Figura 5). O equipamento não detecta a presença / ausência e o tipo de cones. É por isso essencial que estes sejam correctamente associados às barretes correspondentes ao teste pretendido e que estejam devidamente colocados no bloco de cones (posição no bloco de cones deve corresponder à mesma posição da barrete de reagentes no suporte de barretes). Caso contrário, o resultado do teste não será válido (*bioMérieux*, 2005).



**Figura 5** – Barrete simples de reagentes e cone tipo identificados com o autocolante colorido. Retirado de [www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt).

### I.5.6. Calibração

Na produção de cada novo lote de cones e barretes é efectuada uma calibração. O princípio consiste em determinar a equação matemática que representa a curva de calibração (curva de calibração referência). Ou seja, a relação do RFV (Valor de Fluorescência Relativa) em função da concentração dos calibradores (soluções cujo título é perfeitamente conhecido) (*bioMérieux*, 2005).

Sempre que um novo lote é utilizado, é necessário efectuar uma nova calibração que consiste em estabelecer uma nova curva de calibração a partir da curva de calibração referência. A nova curva é baseada em 4 pontos da curva de calibração referência (que a definem de forma única e completa) e que se encontram impressos no cartão *MLE* sob a forma de código de barras (o programa informático VIDAS calcula a curva global a partir destes dados). A nova curva é também baseada nos resultados dos testes do(s) calibrador(es) testados em duplicado ou em

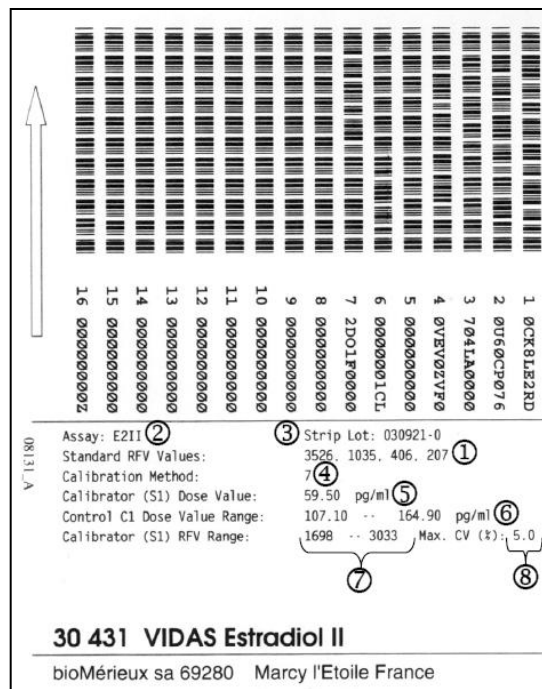
triplicado e os controlos (positivo e negativo) permitem validar a nova calibração. Esta nova calibração tem, necessariamente, de ser recalculada para corrigir as diferenças de nível de sinal entre os *mini VIDAS* e é válida durante 14 dias. Após este período é necessário passar novamente o calibrador, presente em cada embalagem de reagentes, em duplicado ou em triplicado (*bioMérieux*, 2005).

### **I.5.7. Dados de fabrico**

Cada embalagem de reagentes contém um cartão *MLE* (Figura 6) onde estão impressos, sob a forma de código de barras, os dados de fabrico. Estes dados são específicos de um determinado parâmetro, são introduzidos uma única vez para cada lote e permitem estabelecer a curva de calibração de cada teste. Além dos 4 pontos da curva de calibração referência, o cartão *MLE* contém a seguinte informação (*bioMérieux*, 2005):

- Código do teste;
- Número de lote;
- Modelo matemático utilizado para estabelecer a curva de calibração (*Rodbard*, *Semilog* ou *Polinomial*);
- Concentração do calibrador;
- Valores limites sobre os controlos presentes na embalagem;
- Valores limites para os RFV do calibrador;
- Coeficiente máximo de variação dos duplicados ou triplicados dos RFV do calibrador.

Os dados de fabrico podem ser introduzidos no equipamento manualmente (digitando o conjunto de caracteres do código de barras) ou automaticamente (através do leitor de código de barras externo). Quando a introdução estiver concluída o sistema *mini VIDAS* verifica a exactidão dos códigos de barras introduzidos (*bioMérieux*, 2005).



**Figura 6** – Exemplo de um cartão *MLE* presente em cada embalagem de reagentes. Sendo: 1 - quatro níveis de RFV; 2 – código do teste; 3 – número de lote; 4 – método de cálculo (7: Rodbard, 8: Polinomial, 9: Semilog); 5 – concentração do calibrador; 6 – valores limites dos controlos presentes na embalagem; 7 – valores limites para os RFV do calibrador; 8 – coeficiente máximo de variação dos duplicados ou triplicados dos RFV do calibrador. Retirado de *bioMérieux* (2005).

### I.5.8. Resultado do teste

No final de cada teste o resultado é analisado automaticamente pelo equipamento. São efectuadas duas medidas de fluorescência na cuvete de leitura: uma leitura correspondente ao branco da cuvete (antes de o substrato entrar em contacto com o cone) e uma segunda leitura após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O RFV da amostra é obtido através da diferença entre estas duas medições (*bioMérieux*, 2008; *bioMérieux*, 2009).

Para os testes qualitativos realizados em barretes simples de reagentes, o resultado final fornecido pelo equipamento é baseado na comparação entre o RFV da amostra testada e o RFV do calibrador. O valor de teste (VT) para cada amostra é obtido através da fórmula presente na Figura 7. O VT é comparado com o conjunto dos valores limites pré-programados e o resultado é interpretado como positivo (VT igual ou superior ao limiar) ou negativo (VT inferior ao limiar). Um resultado negativo significa que a amostra não contém antígenos do microrganismo alvo ou que os antígenos estão presentes numa concentração inferior ao limite de detecção. Um resultado positivo significa que a amostra se encontra contaminada com o microrganismo alvo.

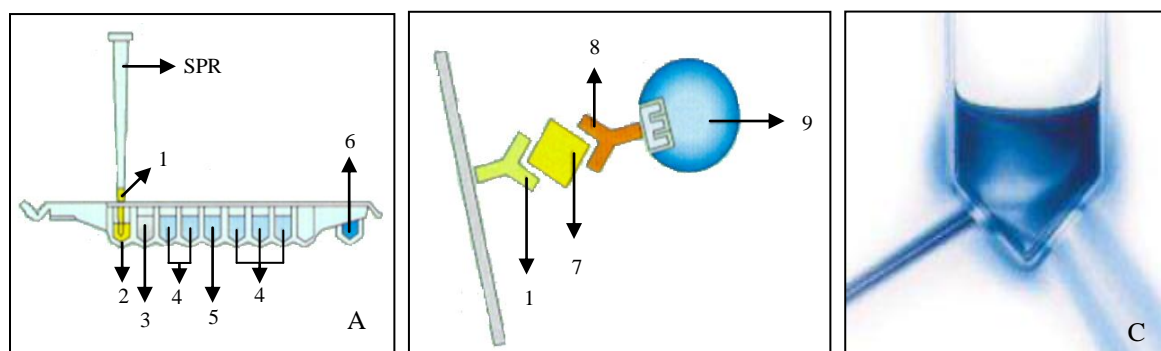
Quando a execução dos testes numa secção termina o sistema *mini VIDAS* imprime uma folha de resultados que inclui o RFV, o VT e a interpretação dos resultados (*bioMérieux*, 2005).

$$\text{Valor de teste} = \frac{\text{RFV}_{\text{amostra}}}{\text{RFV}_{\text{calibrador}}}$$

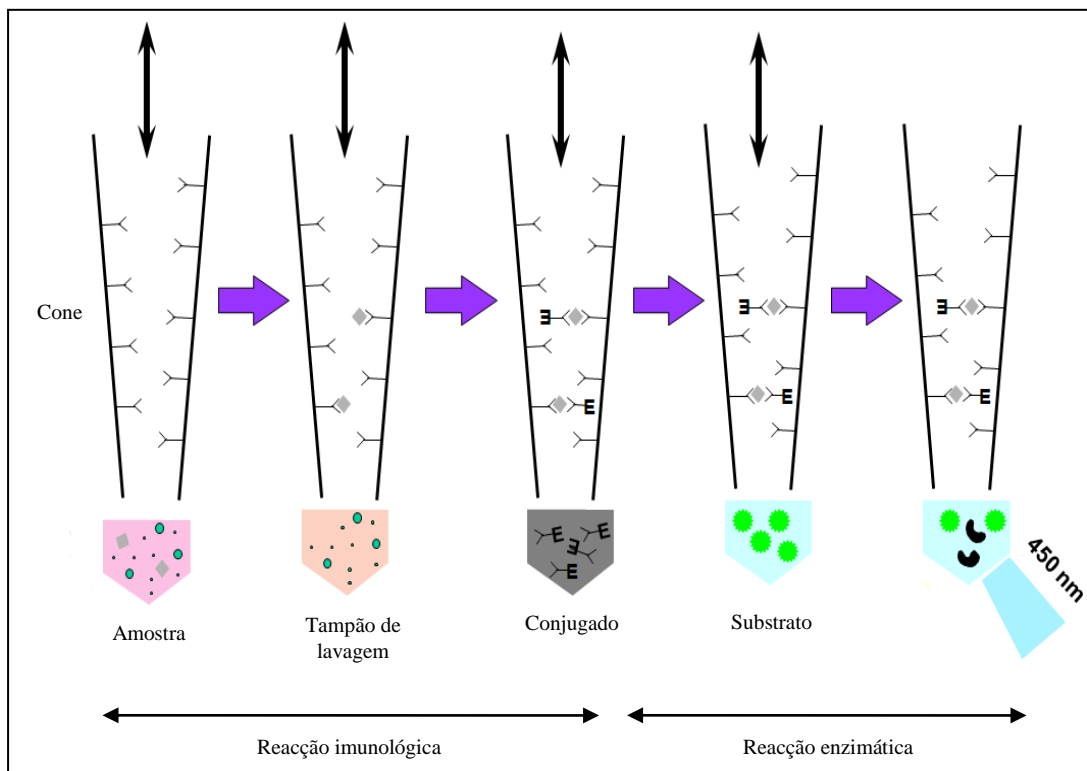
**Figura 7** - Fórmula utilizada para o cálculo de VT. Adaptado de *bioMérieux* (2009).

### I.5.9. Princípio de funcionamento dos testes

Cada cone é sensibilizado, na altura do fabrico, com anticorpos específicos dos antigénios do microrganismo alvo e os restantes reagentes da reacção imunológica encontram-se pré-repartidos na barrete de reagentes, prontos a utilizar. Os antigénios presentes na alíquota adicionada ao poço amostra da barrete de reagentes, vão fixar-se aos anticorpos que se encontram adsorvidos na superfície interior do cone e diversas etapas de lavagem eliminam os elementos livres. Os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e vão fixar-se aos antigénios que já se encontram fixados aos anticorpos da parede interior do cone, formando um complexo (Figura 8). Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado e na etapa final, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado no cone e a enzima do conjugado catalisa a reacção de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm (Figura 9) (*bioMérieux*, 2008; *bioMérieux*, 2009).



**Figura 8** - Funcionamento do sistema VIDAS: (A) captura de antígenos; (B) anticorpo conjugado com uma enzima liga-se ao antígeno (*sandwich*); (C) a intensidade da reacção é avaliada pelo sistema. Sendo: 1-anticorpos fixados; 2-amostra; 3-diluyente; 4-tampão de lavagem; 5-conjugado; 6-substrato; 7-antígeno a ser testado; 8-anticorpo conjugado com fosfatase alcalina; 9: 4-metil-umbeliferil fosfato. Adaptado de *bioMérieux* (2008).



**Figura 9** - Detecção dos antígenos através do sistema VIDAS. Adaptado de *bioMérieux* (sd).

### I.5.10. Quality Control VIDAS

O Quality Control VIDAS (QVC) é um teste automatizado nos equipamentos VIDAS e *mini* VIDAS que permite detectar um funcionamento anómalo do sistema de pipetagem e do sistema óptico fluorimétrico. A embalagem do teste QVC é composta por 60 barretes e 60 cones, prontos a usar, e por 1 folheto informativo. As barretes são cobertas por uma folha de alumínio com um código de barras que contém toda a informação relativa ao tipo de teste, ao número de lote e à data de validade. Este teste deve ser efectuado, no mínimo, uma vez por mês, ou sempre que se suspeita de um funcionamento anómalo, e deve ser realizado em cada uma das seis posições das secções A e B (*mini* VIDAS) que compõem o equipamento, para assegurar um controlo completo do mesmo (*bioMérieux*, 2005).

O teste é realizado através de barretes simples de reagentes contendo soluções padronizadas de substrato fluorescente (4-metil-umbeliferona) mais ou menos concentradas. O teste corresponde a uma série de aspirações e diluições das soluções padronizadas, utilizando o

cone como parte do sistema de pipetagem. As aspirações são efectuadas a velocidades variáveis a fim de testar a capacidade de aspiração (*bioMérieux*, 2005).

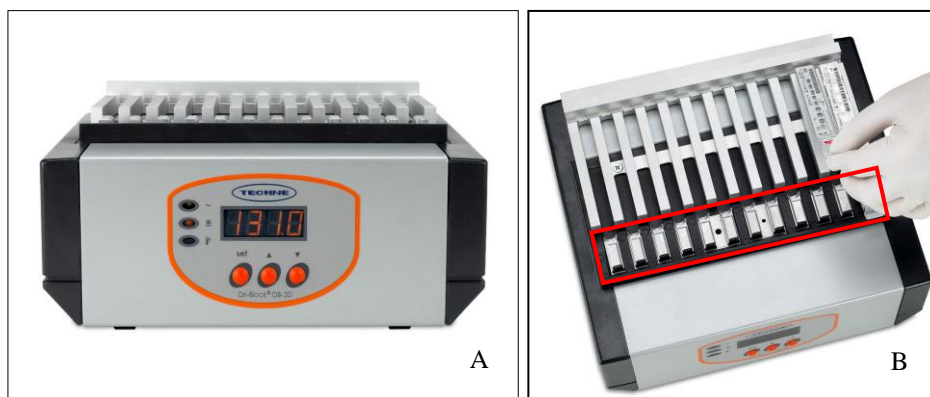
A duração do teste é de, aproximadamente, 20 minutos e são efectuadas 3 leituras. A primeira é efectuada no início do teste e permite verificar a integridade do reagente. A segunda leitura corresponde à verificação da capacidade de transferência do sistema e é efectuada após uma série de aspirações a velocidades variáveis. A terceira leitura possibilita a verificação das capacidades do sistema óptico. No final do teste são calculados 2 valores de teste, TV1 (relação leitura 1 / leitura 2) e TV2 (relação leitura 1 / leitura 3) que devem estar dentro dos limites definidos (*bioMérieux*, 2005).

### I.5.11. VIDAS *Heat & Go*

O VIDAS *Heat & Go* (Figura 10) é um sistema de aquecimento, a seco, especialmente concebido para aquecer as amostras que se encontram nas barretes de reagentes VIDAS, permitindo melhorar a sensibilidade dos testes (*bioMérieux*, 2007).

O equipamento pode ser utilizado na realização de diversos testes, simplificando os protocolos VIDAS, através da eliminação de um passo de pipetagem e evitando a utilização de tubos para o aquecimento da amostra a analisar (*bioMérieux*, 2007).

O equipamento tem capacidade para aquecer 12 barretes de reagentes em simultâneo, tem uma temperatura de funcionamento de  $131,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o bloco de alumínio permite aquecer apenas o poço amostra das barretes de reagentes. Durante o aquecimento apenas o bloco de alumínio apresenta temperaturas elevadas, permanecendo todas as restantes superfícies externas do equipamento a uma temperatura sem perigo ao toque (*bioMérieux*, 2007).



**Figura 10** – Equipamento VIDAS *Heat & Go*: (A) vista frontal; (B) vista de cima com barretes de reagentes e bloco de alumínio (sinalizado a vermelho). Adaptado de *bioMérieux* (2007).

## I.6. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

O presente estudo foi conduzido no laboratório de microbiologia (MICROB) do CTIC, em Alcanena.

O CTIC surge, em 1994, como uma infra-estrutura tecnológica de apoio à indústria de curtumes, visando a promoção e a inovação tecnológica desta indústria a nível nacional. O CTIC assume um papel decisivo na implementação de novas tecnologias (prestando apoio técnico e tecnológico às empresas do sector ou de sectores afins ou complementares), na investigação e no desenvolvimento experimental e na preservação do meio ambiente ([www.ctic.pt](http://www.ctic.pt)).

Ao longo do tempo foi surgindo a procura noutras áreas, nomeadamente ao nível microbiológico. Assim surgiu o MICROB, que faz a recolha, análise e ensaios a águas para consumo humano, águas residuais e recreativas, cosméticos, peles e géneros alimentícios, para além de dar apoio à área de investigação e desenvolvimento do CTIC.

Com o objectivo de obter o reconhecimento da sua qualidade e da sua competência técnica perante potenciais clientes, o MICROB encontra-se, actualmente, em processo de acreditação para a análise microbiológica dos géneros alimentícios para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (encontrando-se já acreditado para amostragem e ensaio a águas de consumo humano).

Sendo a validação de métodos analíticos uma parte fundamental no processo de acreditação, o estudo teve como objectivo a validação interna dos protocolos VIDAS LMO2 e VIDAS *Easy* SLM de acordo com a ISO 16140:2003. Foi realizado um estudo de comparação de métodos entre os referidos protocolos e os métodos de referência ISO 11290-1:1996 (incluindo a ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004) e ISO 6579:2002, respectivamente.

Embora este trabalho abranja apenas o estudo de comparação de métodos, importa mencionar que o CTIC participa no *Food Law Scheme* (2010/2011). No primeiro exercício executado em Maio de 2010, constava na matriz enviada o controlo de *Salmonella* para a qual os resultados obtidos foram concordantes com os resultados esperados.

No âmbito deste estudo, uma vez que os protocolos VIDAS referidos já se encontram validados pelo fabricante (*bioMérieux*), foram apenas avaliados os seguintes parâmetros de desempenho dos métodos: desvio positivo, desvio negativo, exactidão relativa, especificidade relativa e sensibilidade relativa.

---

---

## **II**

### **Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

---

---

## II.1. INTRODUÇÃO

### II.1.1. Caracterização de *Listeria monocytogenes*

*Listeria (L.) monocytogenes* pertence ao género *Listeria*, ao qual pertencem também outras cinco espécies: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). *L. monocytogenes* é conhecida como uma bactéria patogénica para o homem e para os ruminantes, enquanto *L. ivanovii* é considerada patogénica apenas para os ruminantes (Guillet *et al.*, 2010). Apesar de *L. monocytogenes* ser considerada a principal espécie patogénica, do género *Listeria*, para o homem, ocorreram casos raros de doença causados por *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. innocua* (Jeyaletchumi *et al.*, 2010).

#### II.1.1.1. Caracterização bioquímica

Todas as espécies do género *Listeria* são bactérias Gram positivas em forma de bastonete que possuem flagelos que lhes conferem mobilidade. Diversos testes bioquímicos permitem a identificação das diferentes espécies: todas as bactérias deste género são catalase positiva, a acidificação de *D-xylose*, *L-rhamnose* e *D-mannitol* permite uma distinção entre as espécies (Tabela 1) e a diferenciação de *L. monocytogenes* das restantes espécies não patogénicas do mesmo género é possível através da sua capacidade de hemólise (lise das células sanguíneas). Contudo *L. ivanovii* é também hemolítica e *L. seeligeri* apresenta uma capacidade de hemólise variável (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008; Jeyaletchumi *et al.*, 2010).

**Tabela 1-** Algumas reacções bioquímicas das espécies do género *Listeria*.

Espécie	Reacção bioquímica			
	Catalase	Hemólise	Xylose	Ramnose
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	-
<i>L. innocua</i>	+	-	-	V
<i>L. seeligeri</i>	+	(+)	+	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	+	V
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	+	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	+	-	-	V

V, reacção variável; (+), reacção fraca; +, >90 % de reacções positivas; -, sem reacção.

Adaptado de ISO 11290-1:1996.

### II.1.1.2. Caracterização sorológica

*Listeria monocytogenes* pode ser dividida em 13 sorovares com base nos antígenos O (somáticos) e nos antígenos H (flagelares). Existem 15 subtipos de antígenos O (I a XV) e 4 subtipos de antígenos H (A a D) cujas combinações permitem identificar os 13 sorovares de *L. monocytogenes* (Jeyaletchumi *et al.*, 2010).

A caracterização sorológica desempenha um papel importante na vigilância da saúde pública e nas investigações de surtos, ajudando a identificar a origem da contaminação (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Embora todos os sorovares sejam susceptíveis de causar doença, 98 % das bactérias isoladas em humanos infectados com *Listeria monocytogenes* correspondiam apenas aos sorovares: 1/2a, 1/2b e 4b. Os sorovares 1/2a e 1/2b são os mais frequentemente isolados em alimentos e estão ligados a casos esporádicos, enquanto o sorovar 4b é responsável pela maioria dos surtos epidemiológicos (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008; Jeyaletchumi *et al.*, 2010).

### II.1.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência

*Listeria monocytogenes* é um competidor relativamente fraco em relação a outros microrganismos, no entanto, tem capacidade para sobreviver em condições desfavoráveis quando comparada a outras bactérias patogénicas. *L. monocytogenes* consegue multiplicar-se a temperaturas entre os 0 °C e os 45 °C (com uma velocidade de multiplicação máxima aos 37 °C) e sobreviver a temperaturas de congelação. Temperaturas acima dos 50 °C eliminam esta bactéria, tornando a pasteurização num processo adequado à eliminação da mesma (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Em meios de cultura de laboratório *Listeria monocytogenes* cresce a pH 4.4 e abaixo de pH 4.3 pode sobreviver mas não se multiplica. Ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido acético, ácido cítrico e o ácido láctico a 0,1 % podem inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). *L. monocytogenes* tem capacidade para crescer em ambientes com elevadas concentrações de sal (6,5 %) e consegue mesmo crescer na presença de 10 % a 12 % de cloreto de sódio (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Relativamente à actividade da água ( $a_w$ ), a bactéria cresce em valores de  $a_w$  superiores ou iguais a 0,97 (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

### II.1.2. Reservatórios

*Listeria monocytogenes* é uma espécie anaeróbia facultativa que se encontra largamente presente no meio ambiente, tendo sido isolada em solos, águas superficiais e subterrâneas, vegetação e silagem (Freitag *et al.*, 2009). Diferentes estudos referem ainda o isolamento desta bactéria em fezes de animais saudáveis, de humanos com listeriose e portadores assintomáticos (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

A presença de *Listeria monocytogenes* em solos pode ser devida a contaminações provenientes de material fecal ou de plantas em decomposição. A bactéria sobrevive devido ao ambiente fresco e húmido proporcionado pelo solo e pelos nutrientes fornecidos pelo material em decomposição (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Lyautey *et al.* (2007) investigaram a prevalência e as características destas bactérias isoladas nas águas superficiais provenientes da bacia hidrográfica do *South Nation River* em *Ontario*, Canadá. Os dados obtidos indicam uma presença generalizada da bactéria nas águas superficiais estudadas, representando esta presença um grande problema para a saúde pública, que está relacionado com a utilização das terras agrícolas.

Pauly e Tham (2003) estudaram a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em silagem de capim. Concluíram que esta bactéria pode sobreviver entre 30 a 90 dias em silagens não tratadas, revelando uma via de contaminação dos animais que posteriormente podem representar uma fonte de infecção para o ser humano.

### II.1.3. Ambiente de processamento dos alimentos

A entrada de *Listeria monocytogenes* nas instalações de processamento dos alimentos pode ocorrer através de diferentes vias: vestígios de terra presente no calçado e na roupa dos trabalhadores, alimentos crus de origem animal (ex: carne e leite) e, possivelmente, através de humanos portadores assintomáticos da bactéria. *L. monocytogenes* pode estar presente nas carcaças por contaminação fecal durante o abate e pode também estar presente nas mãos dos trabalhadores, mesmo após a sua lavagem (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Outro aspecto importante é o facto de a bactéria ter capacidade para aderir às superfícies das instalações (incluindo superfícies de aço inoxidável, vidro e borracha), conduzindo à formação de biofilmes. Sendo de particular importância as superfícies que entram em contacto directo com os produtos processados (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). Segundo Guilbaud *et al.* (2005), as bactérias aderentes podem adquirir novas propriedades fisiológicas que conferem resistência aos desinfetantes e aos produtos de higienização, criando

a oportunidade de contaminação ou recontaminação dos produtos processados (Doyle e Beuchat, 2007).

Apesar de *Listeria monocytogenes* não formar esporos, ela pode persistir durante largos períodos de tempo (até mesmo durante alguns anos) em ambientes de processamento (Freitag *et al.*, 2009).

#### II.1.4. Presença nos alimentos

A transmissão de *Listeria monocytogenes* através dos alimentos foi documentada pela primeira vez em 1981, durante um surto no Canadá provocado pela ingestão de repolho cru contaminado com a bactéria. Seguiram-se vários surtos e um aumento geral da incidência na Europa e na América do Norte durante a década de oitenta (Guerra e Bernardo, 2004; Montville e Mathews, 2008).

*Listeria monocytogenes* encontra-se frequentemente presente em alimentos crus (tanto de origem animal como vegetal), podendo também estar presente em alimentos cozinhados que sofreram contaminação após o seu processamento. Tem sido isolada de alimentos como carnes cruas e prontas a comer, aves, leite cru, queijo (principalmente as variedades de pasta mole), gelados de natas, peixe cru, peixe fumado e vegetais crus. Mesmo quando o número inicial de células é baixo, o microrganismo pode multiplicar-se durante o armazenamento, inclusive a temperaturas de refrigeração (Tabela 2) (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Os dados recolhidos ao longo dos últimos anos, no que respeita à origem das contaminações, sugerem que existem alimentos mais perigosos do que outros. Os alimentos considerados de alto risco são (Guerra e Bernardo, 2004): os designados alimentos “prontos a comer” e armazenados a temperaturas de refrigeração durante longos períodos de tempo, de modo a permitir a multiplicação de *Listeria* spp., e alimentos contaminados com elevados níveis de *L. monocytogenes* (> 100 ufc / g ou mL).

Os produtos “prontos a comer” (*ready-to-eat - RTE*) representam um elevado risco de contaminação uma vez que muitas das vezes são armazenados em condições de refrigeração e não necessitam de um grande processamento antes de serem consumidos. Estes factos proporcionam um ambiente favorável ao crescimento da bactéria (Guenther *et al.*, 2009). Esta categoria engloba uma grande variedade de alimentos incluindo leite não pasteurizado e produtos preparados a partir do mesmo, queijos de pasta mole não fermentados, alguns produtos de charcutaria e avícolas e alguns produtos da pesca (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

**Tabela 2** – Incidência de *Listeria monocytogenes* em diferentes matrizes alimentares.

Sample type	Number of samples	Positive samples	Incidence (%)
Frozen sliced courgette	106	18	17.0
Frozen broccoli	37	6	16.2
Frozen aubergine	37	0	—
Frozen sliced green peppers	31	7	22.6
Frozen peas	27	4	14.8
Frozen sliced red peppers	33	0	—
Raw milk	6	1	16.7
Pasteurized milk	28	0	—
Cheese made from pasteurized milk	371	6	1.6
Fresh cheese (' <i>queijo fresco</i> ')	50	2	4.0
Raw chicken (muscle)	15	9	60
Raw (red) meat	17	3	17.7
Ham	4	1	25
Dry cured ham (' <i>presunto</i> ')	44	1	2.3
Spanish-style sausage	27	1	3.7
Smoked sausages	48	0	—
Blood sausages	9	1	11.1
Raw fish	25	3	12.0
Shellfish	8	0	—
Flour	27	5	18.5
Pastry	73	3 <sup>a</sup>	4.1
Dried fruits (walnut, hazelnut, pine-nut, sultana, apricot)	12	1	8.3
Total	1035	72	7.0

<sup>a</sup>Of the 3 positive samples 1/3 was from a chicken pie and 2/22 from desserts with cream.

Retirado de Mena *et al.* (2004).

O número de células de *Listeria monocytogenes* a partir do qual ocorre infecção nos humanos ainda não foi determinado. Pensa-se, no entanto, que esta dose seja relativamente elevada para indivíduos saudáveis (>100 células viáveis/g ou ml) (ICMSF, 2000). Considerando os dados publicados em relação aos números de células de *L. monocytogenes* encontradas em alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, verifica-se que são sempre superiores a 100 ufc / g (Guerra e Bernardo, 2004).

Actualmente países como os EUA, Itália e Austrália, seguem a política da “tolerância-zero” para a presença de *Listeria monocytogenes* em qualquer tipo de alimento “pronto a comer”, capaz de sustentar a multiplicação da bactéria e mantido a temperaturas de refrigeração por

longos períodos. Por outro lado, a legislação de países como a Alemanha e a Holanda, prevê a tolerância de níveis <100 ufc de *L. monocytogenes* / g no alimento no momento do consumo. A “tolerância-zero” é imposta para alguns tipos de alimentos e, para outros admitem-se níveis <100 ufc / g alimento (FAO / WHO, 2000; FAO / WHO, 2004; Guerra e Bernardo, 2004). De acordo com os critérios de segurança dos géneros alimentícios do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamentos N.º 1441/2007 e N.º 365/2010, os géneros alimentícios destinados a lactentes têm “tolerância zero” em 25 g de alimentos prontos para consumo. De acordo com o mesmo regulamento, existe um limite de 100 ufc/g no caso de alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento da bactéria (excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos), aplicando-se este critério durante o período de vida útil dos produtos colocados no mercado.

## II.1.5. Listeriose

### II.1.5.1. Etiologia

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença rara mas muito grave, com uma taxa de mortalidade de 20 % a 30 % (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). A bactéria encontra-se adaptada, tanto ao meio ambiente, como ao interior das células do hospedeiro, onde é capaz de fazer a transição para um estado fisiológico que permite a sua sobrevivência. A infecção ocorre pela ingestão de alimentos contaminados (Tabela 3) (Freitag et al., 2010).

A listeriose apresenta-se como uma infecção oportunista no Homem, com manifestações clínicas graves. Existem grupos de risco muito bem categorizados que incluem as grávidas e os seus fetos, os recém-nascidos, os idosos e os adultos com um sistema imunitário deprimido cuja resistência à doença é baixa (doentes de cancro, transplantados e indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana - VIH) (Guerra e Bernardo, 2004; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

As grávidas podem sofrer, particularmente no terceiro trimestre, sintomas de gripe ligeira. Contudo a infecção propaga-se via placenta podendo causar o nascimento prematuro ou a morte do feto. Em adultos, que não grávidas, a bactéria causa septicemia, meningite e encefalite. O período de incubação é de até 5 semanas (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Uma segunda doença pode também ser provocada por esta bactéria: a gastroenterite febril que afecta a população fora dos grupos de risco, sendo a febre e a diarreia os sintomas mais

consistentes. Esta manifestação difere da primeira por um período de incubação bastante mais curto (18h a 27 h). O primeiro caso deste tipo de gastroenterite foi documentado em 1994, devido à contaminação de leite com chocolate após o seu processamento; setenta e cinco por cento das pessoas que beberam este leite adoeceram (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

**Tabela 3** - Alimentos associados a surtos de listeriose humana.

Ano	País	Alimento	Nº casos	Nº mortes
1979 <sup>1</sup>	EUA (Boston)	vegetais crus	23 adultos	3
1981 <sup>2</sup>	Canadá	repolho cru	7 adultos	2
			34 grávidas	16 fetos
1983 <sup>3</sup>	EUA (Boston)	leite pasteurizado	42 adultos	14
			7 grávidas	
1985 <sup>4</sup>	EUA (Califórnia)	queijo pasta mole tipo mexicano	49 adultos	18
			44 grávidas	30 abortos
1983-87*	Suíça (Cantón de Vaud)	queijo pasta mole “vacherin”	122	31
1986-87*	EUA (Filadélfia)	queijo “brie”	36	16 (2 recém nascidos)
1987-89 <sup>5</sup>	Reino Unido	“pâté”	366	0
1992 <sup>6</sup>	França	língua de porco com gelatina	279	63
				22 abortos
1993 <sup>7</sup>	França	“pâté” de porco	38	0
1996 <sup>8</sup>	Itália (San Giorgio di Piano)	salada de arroz	30 jovens adultos	0
				sintomas
1997 <sup>9</sup>	Itália	salada de atum e milho	1500 pessoas, maioria crianças	0
1998 <sup>10</sup>	EUA	“hamburguers”	40 (6 recém nascidos)	4
1999 <sup>11</sup>	Finlândia	manteiga	25	6
1999 <sup>12</sup>	França	“rilletes”	10	3
1999-00 <sup>12</sup>	França	língua de porco com gelatina	26	7 (5 adultos, 2 recém nascidos, 1 aborto)
2000 <sup>13</sup>	EUA	carne de peru “pronta a comer”	29 (8 grávidas)	4
2000-01 <sup>14</sup>	EUA	queijo tipo “mexicano”	12 (10 grávidas)	5 abortos
2002 <sup>15</sup>	Columbia Inglesa	queijo tipo “camembert” e “tomme”	42	2 abortos
2002 <sup>16</sup>	EUA	Carne de peru “pronta a comer”	46	7
				3 abortos

**Legenda:** \*adaptado de Jay, 1996 e Ryser, 1999; <sup>1</sup> Ho *et al.*, 1986; <sup>2</sup>Schlech *et al.*, 1983; <sup>3</sup>Fleming *et al.*, 1985; <sup>4</sup>Linnan *et al.*, 1988; <sup>5</sup>McLaughlin *et al.*, 1991a; <sup>6</sup>Jacquet *et al.*, 1995; <sup>7</sup>Goulet *et al.*, 2001; <sup>8</sup>Salamina *et al.*, 1996; <sup>9</sup>Aureli *et al.*, 2000; <sup>10</sup>Anónimo, 1998; <sup>11</sup>Lytytiikäinen *et al.*, 2000; <sup>12</sup>De Valk, *et al.*, 2001; <sup>13</sup>Anónimo, 2000a. <sup>14</sup>[www.promedmail.org]; <sup>15</sup>[www.bccdc.org/epidemiology/]; <sup>16</sup>Anónimo, 2002.

Retirado de Guerra e Bernardo (2004)

### II.1.5.2. Mecanismos de patogenicidade

Ao contrário de outros microrganismos patogénicos que produzem toxinas ou que se multiplicam no sangue, *Listeria monocytogenes* invade as células do hospedeiro, cresce dentro delas e tem capacidade para passar directamente para as células adjacentes. Esta passagem de célula para célula reduz a exposição da bactéria aos antibióticos e aos anticorpos circulantes. Após a ingestão, as bactérias atravessam a barreira intestinal e através da corrente sanguínea atingem órgãos como o fígado e o baço e podem chegar também ao cérebro e à placenta. A menos que sejam travadas por uma resposta imunitária eficaz, as bactérias continuam a desenvolver-se podendo atingir o sistema nervoso central provocando meningite e encefalite (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

### II.1.5.3. Epidemiologia

No decorrer das duas últimas décadas foram realizados diversos estudos centrados na caracterização da listeriose, dos seus impactos na saúde pública e nos efeitos ao nível da indústria alimentar. No entanto, apesar dos progressos que têm sido alcançados no que respeita à avaliação do risco que *Listeria monocytogenes* representa, existem ainda muitas lacunas que contribuem para o contínuo problema que a listeriose representa actualmente. Uma vez que esta bactéria se encontra tão amplamente distribuída no meio ambiente, as agências regulamentadoras em muitos países, afirmam que é impossível produzir alimentos livres de *L. monocytogenes* (Guerra e Bernardo, 2004).

A listeriose humana só está documentada nos países mais desenvolvidos, sendo a sua incidência desconhecida, ou muito baixa, em África, Ásia e América do Sul e em alguns países Europeus onde a doença não é notificada (Guerra e Bernardo, 2004). De facto, a listeriose não constitui uma doença de declaração obrigatória em Portugal e por este motivo os dados relativos à incidência e prevalência desta doença, no nosso país, são escassos. Contribuindo também o facto de os sintomas clínicos não serem evidentes, dificultando o diagnóstico (Almeida *et al.*, 2006).

De acordo com Almeida *et al.* (2006), foram identificados, pelo menos, 35 casos de listeriose em Portugal no período entre 1994 e 2003. Em 20 dos 35 casos, registaram-se 5 recém-nascidos (25 %), 6 indivíduos com mais de 65 anos (30 %) e a maioria dos doentes pertenciam ao sexo masculino (13 dos 21 casos notificados, 62 %). Os dados relativos a 2003, recolhidos no mesmo estudo, indicam que a incidência da listeriose em Portugal foi na ordem dos 1,4 casos por milhão de habitantes.

Embora *Listeria monocytogenes* seja a única espécie considerada como patogénica para o homem do género *Listeria*, *L. ivanovii*, que representa uma espécie patogénica para os ruminantes, pode muito raramente causar listeriose em seres humanos. Tal como *L. monocytogenes*, a infecção humana causada por *L. ivanovii* está relacionada com imunodeficiência, condições debilitantes e idade (Guillet *et al.*, 2010).

Guillet *et al.* (2010) descreveram um caso de listeriose causada por *L. ivanovii* num adulto do sexo masculino, com 55 anos e com um historial de transplante hepático. A causa parece ter sido a ingestão de queijo artesanal feito a partir de leite de cabra cru. A ocorrência deste tipo de casos levanta algumas questões acerca da especificidade da bactéria *L. ivanovii* para ruminantes. Embora esta rara ocorrência possa estar relacionada com a fraca patogenicidade da bactéria em relação ao ser humano, é apenas ocasionalmente isolada em animais e no meio ambiente, sugerindo uma fraca distribuição na natureza e inclusivamente nos alimentos (Guillet *et al.*, 2010).

## II.2. MATERIAL E MÉTODOS

### II.2.1. Meios de cultura

O método de referência foi executado com os meios de cultura mencionados na norma ISO 11290-1:1996 e sua actualização ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004. A referida actualização prevê a utilização do meio *ALOA* (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*), ou de outro meio equivalente, como o primeiro meio sólido para cultura e identificação da bactéria em placas. No presente estudo foi utilizado o meio *OAA* (*ChromID<sup>TM</sup> Ottaviani Agosti, Bio-Rad*) como primeiro meio de cultura e identificação e o meio sólido *Oxford* como o segundo meio sólido selectivo.

O protocolo VIDAS LMO2 foi realizado com os meios de cultura propostos pelo fabricante. Foram utilizados os seguintes meios: *Fraser 1/2* (*Bio-Rad*) e *Fraser-T* (*bioMérieux*) para as etapas de enriquecimento primário e secundário, respectivamente e o meio cromogénico *OAA* (*Bio-Rad*) para a etapa de confirmação do resultado.

### II.2.2. Amostras

Foram analisados 24 produtos alimentares, pertencentes a 6 categorias de alimentos diferentes: carnes vermelhas, carnes brancas, produtos da pesca, frutas e vegetais, produtos lácteos e produtos de pastelaria. A Tabela 4 apresenta os produtos analisados e agrupados por categoria alimentar.

Os produtos foram analisados em 5 séries (séries A a E) e cada produto representa uma amostra. As séries A a D foram constituídas por 5 amostras e a série E por 4 amostras, independentemente da sua categoria alimentar (Tabela 5). A letra foi conferida a cada série de acordo com a sua ordem cronológica de análise e a atribuição do número de amostra dentro de cada série de análise foi efectuada por ordem alfabética.

Dos 24 produtos analisados, 15 constituíam amostras de contaminação microbiológica desconhecida e 9 foram artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes* (*NCTC 11994*).

Dez produtos (amostras nº 1 a nº 10) pertenciam a 2 clientes do laboratório e os restantes 14 produtos foram adquiridos numa superfície comercial local. Em todos os casos, o tempo decorrido entre a aquisição e a análise dos produtos não ultrapassou as 12 horas.

**Tabela 4** - Produtos alimentares analisados e agrupados por categoria alimentar.

<b>Categoria</b>	<b>Produto</b>	<b>Categoria</b>	<b>Produto</b>	<b>Categoria</b>	<b>Produto</b>
<b>Carnes vermelhas</b>	Bacon embalado	<b>Produtos lácteos</b>	Leite 1	<b>Frutas e vegetais</b>	Agrião 4 <sup>a</sup> gama Banana Maçã Royal Gala
	Chourição		Leite 2		
	Entremeada de porco fresca		Leite 3		
	Fiambre da pá		Leite embalado		
	Moura		Queijo de ovelha 1		
	Paio 1		Queijo de ovelha 2		
	Paio 2				
	Paio 3				
	Paio 4				
	Paio 5				
	Salsicha fresca de porco				
<b>Carnes brancas</b>	Canja de galinha fresca embalada	<b>Produtos de pastelaria</b>	Bola de Berlim Chocolate de leite	<b>Produtos da pesca</b>	Carapau médio fresco

**Tabela 5** - Produtos alimentares analisados, agrupados por série de análise e correspondente número de amostra.

<b>Série</b>	<b>N.º Amostra</b>	<b>Produto alimentar</b>	<b>Tipo de amostra</b>
A	1	Paio 1	Contaminação microbiológica desconhecida  Artificialmente contaminadas com <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>
	2	Paio 2	
	3	Paio 3	
	4	Paio 4	
	5	Paio 5	
B	6	Leite 1	
	7	Leite 2	
	8	Leite 3	
	9	Queijo Ovelha 1	
10	Queijo Ovelha 2		
C	11	Chourição	
	12	Entremeada de porco fresca	
	13	Fiambre da pá	
	14	Moura	
	15	Salsicha de porco fresca	
D	16	Banana	
	17	Canja de galinha fresca	
	18	Carapau médio fresco	
	19	Chocolate de leite em barra	
	20	Maçã Royal Gala	
E	21	Agrião embalado	
	22	Bacon embalado	
	23	Bola de Berlim	
	24	Leite embalado	

### **II.2.3. Preparação das amostras**

A preparação de cada um dos 24 produtos foi efectuada de acordo com as normas internacionais específicas da categoria do produto em questão. Para as carnes vermelhas e carnes brancas foram seguidas as indicações da norma ISO 6887-2: 2003, para produtos lácteos a ISO/FDIS 6887-5:2009 e para frutas e vegetais, produtos de pastelaria e produtos da pesca a norma ISO 6887-4:2003.

### **II.2.4. Preparação da suspensão inicial**

A suspensão inicial foi preparada através da adição de 25 g / 25 ml de cada amostra a 225 ml de *Fraser* ½ (*Bio-Rad*).

### **II.2.5. Contaminação artificial das amostras**

Cada uma das amostras das séries D e E (total de 9 produtos) foram artificialmente contaminadas, no laboratório, com *Listeria monocytogenes* (*NCTC* 11994).

A inoculação foi efectuada na suspensão inicial após a sua homogeneização (produtos sólidos) ou mistura (produtos líquidos). Após um período de repouso de 30 minutos a suspensão inicial foi incubada a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

### **II.2.6. Controlos bacteriológicos**

Em cada uma das cinco séries de análises foram efectuados quatro controlos: os controlos de crescimento positivo e negativo, o branco e o controlo de especificidade.

#### **II.2.6.1. Controlo de crescimento positivo**

O controlo de crescimento positivo consistiu na inoculação de uma cultura pura de *Listeria monocytogenes* (*NCTC* 11994) em 225 ml de *Fraser* ½. A partir desta suspensão realizaram-se todas as restantes etapas dos procedimentos tal como se de uma amostra se tratasse.

### **II.2.6.2. Controlo de crescimento negativo**

O controlo de crescimento negativo foi efectuado em todos os meios de cultura utilizados. Este controlo consistiu na inoculação dos meios com uma cultura pura de *Escherichia coli* (NCTC 9001) e incluiu também a realização do teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II.

### **II.2.6.3. Branco**

O branco foi efectuado com uma amostra constituída unicamente por peptona salina estéril. Esta amostra foi submetida a todas as etapas dos procedimentos, tal como todas as restantes amostras.

### **II.2.6.4. Controlo de especificidade**

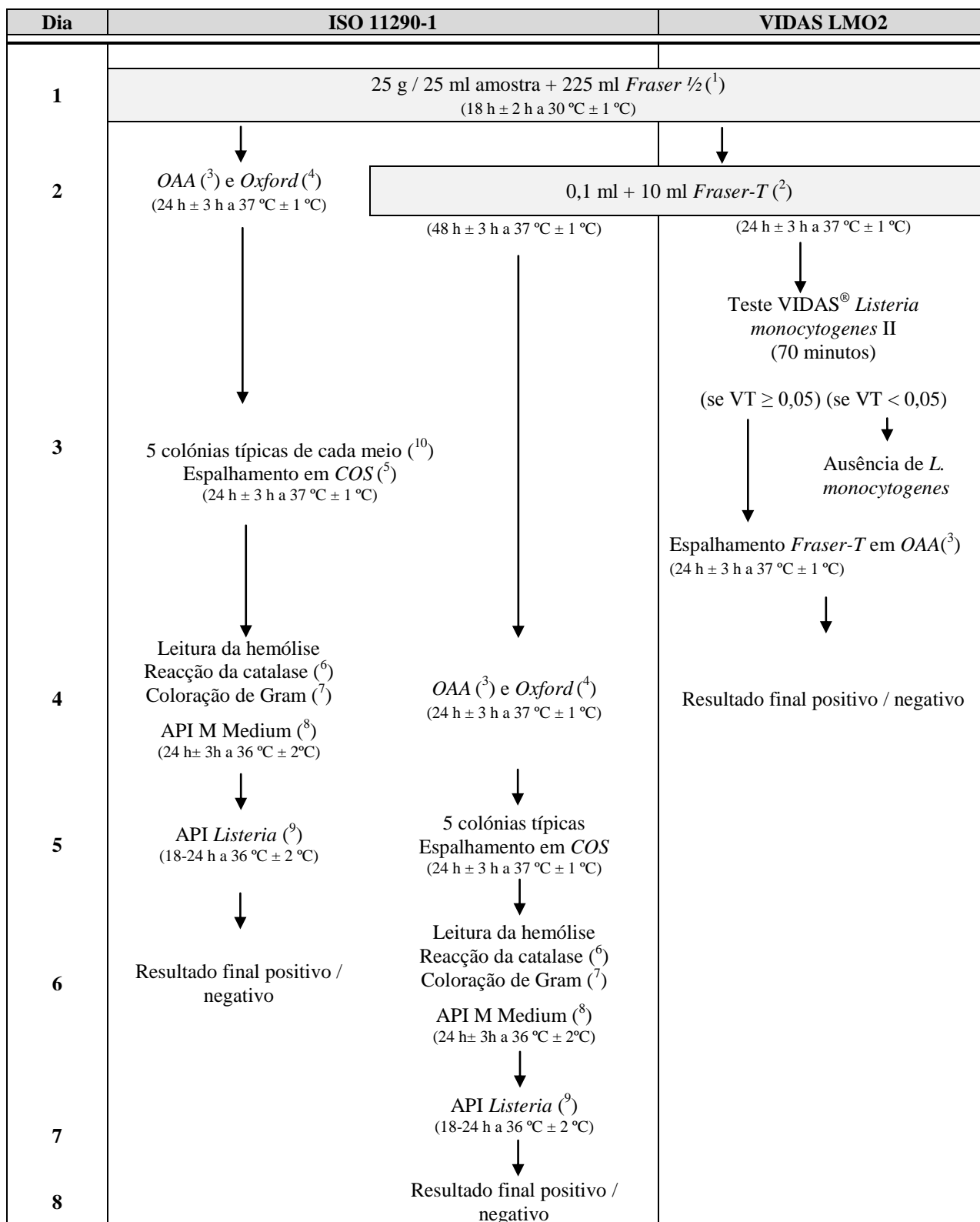
O controlo de especificidade foi efectuado no meio cromogénico OAA e nas galerias API *Listeria* (Apêndice I). Este controlo consistiu na inoculação de uma cultura pura de *Listeria innocua* (NCTC 11288).

### **II.2.7. Detecção de *Listeria monocytogenes***

Cada uma das 24 amostras foi analisada simultaneamente de acordo com dois protocolos: o método de referência para a detecção de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1:1996 incluindo ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004) e o protocolo VIDAS LMO2 proposto pela *bioMérieux* para a detecção da mesma bactéria.

As etapas de enriquecimento primário e secundário são comuns a ambos os métodos executados. Deste modo, foram efectuadas as restantes etapas de cada método a partir da mesma cultura de enriquecimento secundário.

A Figura 11 apresenta esquematicamente as etapas destes dois métodos de ensaio, bem como o número de dias necessários à sua realização. O presente estudo foi efectuado em horário laboral de segunda a sexta-feira, pelo que os dias constantes na figura não representam literalmente o número de dias dispendidos na execução dos ensaios.



**Figura 11** - Representação esquemática dos métodos ISO 11290-1 e VIDAS LMO2 e número de dias necessários à sua realização. Sendo: <sup>(1)</sup> Meio líquido selectivo de enriquecimento primário com reduzida concentração em agentes selectivos (*Fraser* 1/2, *Bio-Rad*); <sup>(2)</sup> Meio líquido selectivo de enriquecimento secundário com concentração completa em agentes selectivos (*Fraser-T*, *bioMérieux*); <sup>(3)</sup> Primeiro meio de cultura sólido selectivo (*ChromID™ Ottaviani Agosti*, *bioMérieux*); <sup>(4)</sup> Segundo meio de cultura sólido selectivo (*Oxford*, *bioMérieux*); <sup>(5)</sup> Meio sólido para isolamento das bactérias exigentes e detecção da hemólise (*Columbia + 5 %* de sangue de carneiro, *bioMérieux*); <sup>(6)</sup> Foi utilizado o reagente de teste para a detecção da enzima catalase (*Bactident® Catalase*, *Merck*); <sup>(7)</sup> Coloração de Gram (*Gram-color, staining set for Gram staining*, *Merck*); <sup>(8)</sup> Meio para teste de mobilidade (*API M Medium*, *bioMérieux*); <sup>(9)</sup> Sistema de identificação das *Listeria* (*API Listeria*, *bioMérieux*, 2007); <sup>(10)</sup> OAA, colónias azul-turquesa rodeadas por um halo opaco bem definido; *Oxford*, colónias cinzentas rodeadas por um halo negro.

### II.2.7.1. Método de referência

O método de referência, efectuado neste estudo, encontra-se descrito na norma ISO 11290-1:1996 e na sua actualização ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004.

### II.2.7.2. Método alternativo

Paralelamente ao método de referência, foi efectuado o protocolo VIDAS LMO2 proposto pela *bioMérieux*.

O protocolo VIDAS LMO2 é composto por duas etapas de enriquecimento (enriquecimento primário e secundário comuns ao método de referência), pelo teste rápido VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II (código de teste LMO2) e por uma etapa de confirmação, quando o resultado do teste é positivo.

#### ▪ Teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II

Após o enriquecimento secundário introduziu-se 0,5 ml, desta cultura, no poço amostra da barrete de reagentes (Tabela 6). A barrete foi colocada no equipamento *mini* VIDAS e todas as etapas seguintes foram realizadas automaticamente pelo equipamento até à saída do resultado.

A Tabela 7 apresenta o limiar do valor de teste (VT) a partir do qual o resultado é considerado como positivo pelo sistema.

**Tabela 6** - Composição da barrete de reagentes do teste VIDAS<sup>®</sup> LMO2.

Poços	Reagentes
1	Poço amostra.
2	Tampão de pré-lavagem (400 µl): TRIS-NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante.
3, 4, 5, 7, 8, 9	Tampão de lavagem (600µl): TRIS-NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante.
6	Conjugado (400 µl): anticorpos anti- <i>L. monocytogenes</i> marcados com fosfatase alcalina + conservante.
10	Cuvete de leitura com substrato (300 µl): 4-metil-umbeliferil-fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina* (DEA) (0,62 ml/l, ou seja, 6,6 %, pH 9,2) + conservante

\* Reagente irritante: R 36 – irritante para os olhos; S 26 – em caso de contacto com os olhos lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico.

Adaptado de *bioMérieux* (2008).

**Tabela 7** - Limiar e interpretação de VT para o teste VIDAS® LMO2.

VIDAS® LMO2	
VT	Interpretação
<0,05	Negativo
≥0,05	Positivo

Adaptado de *bioMérieux* (2008).

#### ▪ Confirmação

Todos os resultados positivos foram sujeitos a uma etapa de confirmação nas 48 horas após o final da incubação do meio líquido *Fraser-T*.

A confirmação foi realizada inoculando a superfície do meio cromogénico *OAA* a partir da cultura de enriquecimento secundário. A placa de *OAA* foi incubada a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  após a qual, a presença de colónias características de *Listeria monocytogenes* é suficiente para a confirmação do resultado como positivo.

#### II.2.8. Parâmetros de desempenho do método

Cada uma das 24 amostras foi analisada pelos dois protocolos mencionados, produzindo um total de 48 resultados qualitativos (positivo / negativo). Estes resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o protocolo presente na norma ISO 16140:2003.

Os resultados finais obtidos por ambos os métodos foram emparelhados de modo a obter os resultados falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN). Com base nestes resultados foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho do método: exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa (Tabela 8).

**Tabela 8** - Fórmulas utilizadas no cálculo da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa.

Parâmetro	Fórmula
Exactidão relativa ( <i>AC</i> )	$AC = \frac{(VP + VN)}{N} \times 100 \%$
Sensibilidade relativa ( <i>SP</i> )	$SP = \frac{VN}{N_-} \times 100 \%$
Especificidade relativa ( <i>ES</i> )	$ES = \frac{VP}{N_+} \times 100 \%$

Sendo: *N* o número total de amostras (*VN* + *VP* + *FP* + *FN*); *N<sub>-</sub>* o número total de resultados negativos com o método de referência (*VN* + *FP*); *N<sub>+</sub>* o número total de resultados positivos com o método de referência (*VP* + *FN*).

## II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi efectuado um estudo de comparação de métodos onde foram analisados 24 produtos alimentares para detecção de *Listeria monocytogenes*. A análise foi executada através do método de referência ISO 11290-1:1996, incluindo ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, e através do método alternativo VIDAS LMO2. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram emparelhados de modo a calcular os parâmetros de desempenho do método alternativo.

### II.3.1. Análise microbiológica dos produtos alimentares

A análise foi efectuada em 5 séries, sendo 3 delas constituídas por amostras de contaminação microbiológica desconhecida e 2 constituídas por amostras artificialmente contaminadas com *L. monocytogenes* (NCTC 11994) (ver Tabela 5, ponto II.2.2.).

Cada uma das amostras foi analisada simultaneamente pelos dois métodos, aproveitando-se o facto de as 2 etapas de enriquecimento (primário e secundário) serem comuns a ambos os métodos (ver Figura 11, ponto II.2.7.).

#### II.3.1.1. Série A

A série A foi constituída por 5 paços do mesmo lote de fabrico (designados por amostras 1 a 5) e provenientes de um cliente do laboratório onde foi realizado o presente estudo. Os resultados obtidos na análise destas amostras, através do método de referência, encontram-se na Tabela 9.

Observou-se apenas o crescimento de colónias atípicas de *Listeria monocytogenes*, em todas as amostras desta série, verificando-se esta presença apenas em meio *Oxford* e essencialmente após o enriquecimento primário (apenas 2 de 5 amostras apresentaram crescimento atípico após o enriquecimento secundário). Entre 1 a 5 colónias atípicas de cada placa foram sujeitas aos testes bioquímicos a fim de despistar a presença de eventuais colónias falsas negativas. As colónias foram repicadas para meio sólido *COS* para o isolamento dos microrganismos e para a expressão da hemólise.

A verificação da hemólise corresponde ao primeiro teste bioquímico efectuado e a sua natureza depende da espécie. Tal como referido no ponto II.1.1., a detecção da hemólise fornece uma orientação relativamente à presença de *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria apresenta uma hemólise que se caracteriza por uma zona clara em torno ou por baixo da respectiva colónia

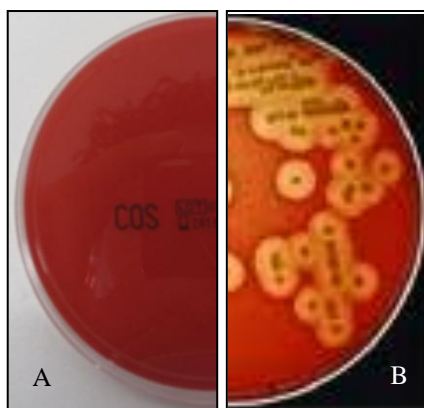
(Figura 12) e as restantes espécies do género *Listeria*, com excepção de *L. ivanovii*, não apresentam hemólise. Uma vez que as colónias atípicas verificadas nas amostras da série A apresentaram hemólise negativa, coloração de Gram negativa e não apresentaram mobilidade, não foram identificadas como *Listeria monocytogenes*.

De acordo com os resultados obtidos através do método de referência, as 5 amostras da série A não se encontravam contaminadas *L. monocytogenes*.

**Tabela 9** – Resultados obtidos através do método de referência na série A.

Resultados do método ISO 11290-1							
Isolamento		Confirmação					Resultado Final
Meio	Colónias	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>	
<b>Amostra 1</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<b>Amostra 2</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<b>Amostra 3</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
<b>Amostra 4</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<b>Amostra 5</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; GN - Gram negativo; SM - sem mobilidade; NE - não efectuado.



**Figura 12** – Presença de hemólise em meio COS: (A) placa não inoculada; (B) placa inoculada com *L. monocytogenes*.

A Tabela 10 contém os resultados obtidos na análise das amostras da série A, através do método VIDAS LMO2. Verifica-se que todas as amostras obtiveram um resultado negativo no teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II com um VT de 0,00. À semelhança dos resultados obtidos através da metodologia de referência, todas as amostras desta série revelaram ausência de *Listeria monocytogenes*.

**Tabela 10** - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 na série A.

Resultados do método VIDAS LMO2					
Amostra	Teste VIDAS <sup>®</sup> <i>Listeria monocytogenes</i> II		Confirmação		Resultado final
	VT	Interpretação	OAA	API <i>Listeria</i>	
1	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
2	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
3	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
4	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
5	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

### II.3.1.2. Série B

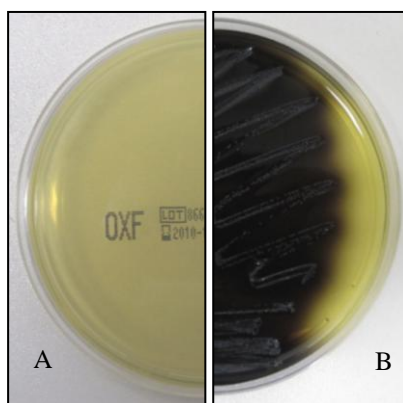
A série B foi composta por 3 leites (amostras 6, 7 e 8) e 2 queijos (amostras 9 e 10) provenientes directamente do produtor, o qual é cliente do laboratório onde decorreu o presente trabalho. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos na análise destas amostras através do método de referência.

Verificou-se a presença de colónias atípicas em todas as amostras em meio *Oxford* e apenas a amostra 7 apresentou colónias atípicas na placa de meio cromogénico *OAA*. Entre 1 a 5 colónias atípicas de cada placa foram sujeitas a testes bioquímicos, não sendo identificadas como *Listeria monocytogenes*.

Nas amostras 9 e 10, para além das colónias atípicas, verificou-se também a presença de colónias típicas apenas em meio *Oxford*. Após a realização dos testes bioquímicos estas colónias não foram identificadas como *Listeria monocytogenes*, representando colónias falsas positivas.

O meio *Oxford* foi o segundo meio sólido selectivo utilizado no método de referência. Este meio é composto por determinados componentes que garantem a sua selectividade em relação aos microrganismos não *Listeria*: cloreto de sódio, acriflavina, colistina, cefotetan, cicloheximida e fosfomicina. O meio contém também esculina cuja hidrólise é revelada pelo aparecimento de um halo negro em torno das colónias. As colónias típicas de *Listeria monocytogenes* em meio *Oxford* são colónias cinzentas rodeadas por um halo negro (Figura 13). O meio *Oxford* não permite, contudo, uma diferenciação directa das colónias de *Listeria monocytogenes* das restantes *Listeria*, daí a importância de efectuar a análise com dois meios de cultura sólidos complementares.

De acordo com os resultados obtidos através do método de referência, as 5 amostras da série B não revelaram presença de *Listeria monocytogenes*.



**Figura 13** – Meio sólido selectivo *Oxford*: (A) placa não inoculada; (B) placa inoculada com *L. monocytogenes*.

**Tabela 11** - Resultados obtidos através do método de referência na série B.

Resultados do método ISO 11290-1							
Isolamento		Confirmação					Resultado Final
Meio	Colónias	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>	
<b>Amostra 6</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA <sup>(1)</sup>	Pos/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	
<b>Amostra 7</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Pos	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Pos	Pos	GN	SM	NE	
<b>Amostra 8</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
<b>Amostra 9</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GP	SM/SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA <sup>(1)</sup>	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	
<b>Amostra 10</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GP	SM/SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	

(1) presença de dois tipos de colónias atípicas.

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; GN – Gram negativo; GP – Gram positivo; SM – sem mobilidade; NE - não efectuado.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na análise das amostras da série B, através do protocolo VIDAS LMO2.

Verifica-se que todas as amostras obtiveram um resultado negativo no teste VIDAS® *Listeria monocytogenes* II com um VT de 0,00. Todas as amostras foram assim consideradas isentas de *Listeria monocytogenes* através do método alternativo.

Estes resultados foram iguais aos resultados obtidos através da metodologia de referência para as mesmas amostras.

**Tabela 12** - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 na série B.

<b>Resultados do método VIDAS LMO2</b>					
Amostra	Teste VIDAS® <i>Listeria monocytogenes</i> II		Confirmação		Resultado
	VT	Interpretação	OAA	API <i>Listeria</i>	
6	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
7	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
8	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
9	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
10	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

### II.3.1.3. Série C

A série C foi composta por chourição (amostra 11), entremeada de porco fresca (amostra 12), fiambre da pá (amostra 13), moura (amostra 14) e salsicha de porco fresca (amostra 15). Todos estes produtos foram adquiridos numa superfície comercial local e analisados no dia da sua aquisição. Os resultados obtidos na análise destas amostras, pelo método de referência, encontram-se na Tabela 13.

Observa-se na referida tabela que todas as amostras da série C apresentaram crescimento de colónias atípicas em ambos os meios de cultura sólidos inoculados. As amostras 11 e 14 apresentaram também crescimento de colónias típicas de *Listeria monocytogenes* que se verificaram apenas em meio *Oxford*. Tanto as colónias típicas como atípicas, que foram sujeitas aos testes de confirmação bioquímica, não foram identificadas como *L. monocytogenes*. Indicando a presença de colónias falsas positivas nas amostras 11 e 14.

**Tabela 13** - Resultados obtidos através do método de referência na série C.

Resultados obtidos do método ISO 11290-1							
Isolamento		Confirmação					Resultado Final
Meio	Colónias	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>	
<b>Amostra 11</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	
<b>Amostra 12</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	CA <sup>(1)</sup>	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
<b>Amostra 13</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	CA <sup>(1)</sup>	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<b>Amostra 14</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	
<b>Amostra 15</b>							
Enriquecimento primário							
<i>OAA</i>	CA <sup>(1)</sup>	Neg/Neg	Pos/Pos	GN/GN	SM/SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	Negativo
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Pos	GN	SM	NE	

(1) presença de dois tipos de colónias atípicas.

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; GN - Gram negativo; SM - sem mobilidade; NE - não efectuado.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos através do protocolo VIDAS LMO2. Todas as amostras apresentaram um resultado do teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II negativo com um VT de 0,00. Todas as amostras foram então consideradas negativas para a presença de

*Listeria monocytogenes*. Estes resultados foram idênticos aos resultados obtidos através do método de referência.

**Tabela 14** - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 na série C.

Resultados do método VIDAS LMO2					
Amostra	Teste VIDAS® <i>Listeria monocytogenes</i> II		Confirmação		Resultado
	VT	Interpretação	OAA	API <i>Listeria</i>	
11	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
12	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
13	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
14	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
15	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

As três primeiras séries de análise foram constituídas por um total de 15 amostras de contaminação microbiológica desconhecida. Apesar de todas estas amostras apresentarem ausência de *Listeria monocytogenes* por ambos os métodos aplicados, houve crescimento de colónias típicas desta bactéria em 4 das 15 amostras (amostras 9, 10, 11 e 14). Estas colónias foram sujeitas a confirmação bioquímica e não foram identificadas como *L. monocytogenes*, representando colónias falsas positivas. As colónias típicas foram apenas verificadas em meio *Oxford* e não foram verificadas colónias falsas negativas com nenhum dos meios sólidos utilizados.

A ausência de *Listeria monocytogenes* nestas 15 amostras está de acordo com os critérios de segurança dos géneros alimentícios definidos no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamentos N.º 1441/2007 e N.º 365/2010.

#### II.3.1.4. Série D

A série D foi constituída por 5 produtos adquiridos numa superfície comercial local: banana (amostra 16), canja de galinha fresca (amostra 17), carapau médio fresco (amostra 18), chocolate de leite em barra (amostra 19) e maçã Royal Gala (amostra 20). Todas estas amostras foram artificialmente contaminadas com *Listeria monocytogenes* (NCTC 11994).

A Tabela 15 contém os dados obtidos na análise das amostras da série D através do método de referência.

Verifica-se que todas as amostras apresentaram crescimento de colónias típicas e que, tal como seria espectável, foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. A amostra 17 apresentou também crescimento de colónias atípicas, mas as mesmas não foram identificadas como *L. monocytogenes*.

**Tabela 15** - Resultados obtidos através do método de referência na série D.

Resultados obtidos do método ISO 11290-1								
Isolamento		Confirmação					Resultado Final	
Meio	Colónias	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>		
<b>Amostra 16</b>								
Enriquecimento primário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	Positivo	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Enriquecimento secundário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<b>Amostra 17</b>								
Enriquecimento primário								
<i>OAA</i>	CA / CT	Neg/Pos	Pos/Pos	GN/GP	SM/CM	NE/ <i>L. m.</i>	Positivo	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Enriquecimento secundário								
<i>OAA</i>	CA / CT	Neg/Pos	Pos/Pos	GN/GP	SM/CM	NE/ <i>L. m.</i>		
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<b>Amostra 18</b>								
Enriquecimento primário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	Positivo	
<i>Oxford</i>	CA	Pos	Pos	GN	SM	NE		
Enriquecimento secundário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<i>Oxford</i>	CA	Pos	Pos	GN	SM	NE		
<b>Amostra 19</b>								
Enriquecimento primário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	Positivo	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Enriquecimento secundário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<b>Amostra 20</b>								
Enriquecimento primário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	Positivo	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Enriquecimento secundário								
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; GN - Gram negativo; GP - Gram positivo; SM - sem mobilidade; CM - com mobilidade; NE - não efectuado; *L. m.* - *Listeria monocytogenes*.

É de referir que no caso da amostra 18 as colónias típicas verificaram-se apenas em meio *OAA* e que o meio *Oxford* apresentou apenas colónias atípicas. Recorrendo aos dados da Tabela 16, relativos aos resultados obtidos para as amostras desta mesma série através do método VIDAS LMO2, verifica-se que a amostra 18 obteve um VT de 0,45. Este valor foi bem mais baixo quando comparado aos valores de VT obtidos nas restantes amostras da mesma série (VT > 1,60; com excepção da amostra 17). Este facto sugere que a concentração de células de *L. monocytogenes* presentes na cultura de enriquecimento secundário da amostra 18 seria muito baixa não crescendo em meio *Oxford*. Vlaemynck *et al.* (2000), efectuaram um estudo de comparação entre o meio *ALOA* (cujo princípio e composição é idêntico a *OAA*), *Oxford* e *PALCAM* e verificaram que o meio *ALOA* foi mais sensível que o meio *Oxford* na detecção de *L. monocytogenes*, com uma sensibilidade de 86,1 % e de 61,1 %, respectivamente.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na análise das amostras da série D através do método VIDAS LMO2.

Verifica-se que todas as amostras, excepto a amostra 17, apresentaram um resultado positivo no teste VIDAS® *Listeria monocytogenes* II e que todas as amostras obtiveram um resultado final positivo para a presença de *Listeria monocytogenes*.

**Tabela 16** – Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 na série D.

<b>Resultados do método VIDAS LMO2</b>					
Amostra	Teste VIDAS® <i>Listeria monocytogenes</i> II		Confirmação		Resultado
	VT	Interpretação	<i>OAA</i>	API <i>Listeria</i>	
16	1,66	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
17	0,03	Negativo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
18	0,45	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
19	1,80	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
20	1,75	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
<b>Resultado após nova incubação do tubo Fraser-T</b>					
17	0,02	Negativo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo

VT - valor de teste; CT – colónias típicas.

Obteve-se um VT de 0,03 para a amostra 17 (inferior ao limiar que é de 0,05) sendo por isso interpretada pelo sistema como um resultado negativo. Uma vez que este resultado não correspondeu ao resultado esperado, procedeu-se a uma nova incubação do mesmo tubo *Fraser-T* correspondente a esta amostra (24 h ± 3 h adicionais a 37 °C ± 1 °C). Após o período de

incubação repetiu-se o teste VIDAS® *Listeria monocytogenes* II e uma vez mais obteve-se um resultado negativo com um valor de teste de 0,02; inferior ao anteriormente obtido (0,03).

Uma explicação para o sucedido pode estar relacionada com o modo de inoculação. A estirpe de referência utilizada na contaminação artificial encontrava-se no estado liofilizado e congelado e este estado fragilizado pode ter originado uma recuperação insuficiente das células durante o enriquecimento primário. No entanto como o valor de teste foi de 0,03, e não de 0,00, indica a presença da bactéria numa concentração inferior ao limite de detecção.

Uma vez que a amostra havia sido inoculada com *Listeria monocytogenes* e apesar do sistema VIDAS ter fornecido um resultado negativo, procedeu-se à etapa de confirmação. Esta etapa, de acordo com o protocolo VIDAS LMO2, é realizada apenas através da inoculação de uma placa de OAA e a presença de colónias características é suficiente para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*. Foi inoculada uma placa de OAA a partir do tubo *Fraser-T* e após a incubação da placa verificou-se a presença de colónias azul-turquesa rodeadas por um halo opaco bem definido. Estas colónias são características de *L. monocytogenes*, sendo este facto suficiente para considerar um resultado final positivo para a amostra número 17.

O meio OAA é um meio cromogénico (referido pela norma ISO 11290-1:1996/Amed.1:2004 como o primeiro meio sólido de isolamento selectivo) que permite distinguir a espécie *Listeria monocytogenes* das restantes bactérias do mesmo género. O seu carácter diferencial é fornecido pela adição de um substrato cromogénico que permite a identificação de actividades enzimáticas específicas em determinados microrganismos. Todas as espécies do género *Listeria* desenvolvem colónias azuis turquesa, resultantes da actividade glucosidase. A diferenciação de *L. monocytogenes* das restantes *Listeria* baseia-se no aparecimento de um halo opaco em torno da colónia como resultado da actividade fosfolipase C (Figura 14).



**Figura 14** - Placa de OAA com presença de colónias típicas (traço contínuo) e atípicas (a tracejado) de *L. monocytogenes*.

### II.3.1.5. Série E

A série E foi a última série de amostras analisadas neste estudo e foi composta por 4 produtos alimentares adquiridos num supermercado local: agrião embalado (amostra 21), bacon embalado (amostra 22), bola de berlim (amostra 23) e leite embalado (amostra 24). Todos os produtos foram analisados no dia da sua aquisição e foram artificialmente contaminados com *Listeria monocytogenes* (NCTC 11994).

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos na análise destes 4 produtos pelo método de referência. Verifica-se que duas amostras foram negativas para a presença de *Listeria monocytogenes* (amostras 21 e 22) e as outras duas amostras foram positivas para a presença desta bactéria (amostras 23 e 24).

**Tabela 17 - Resultados obtidos através do método de referência na série E.**

Resultados do método ISO 11290-1							
Isolamento		Confirmação					Resultado Final
Meio	Colónias	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>	
<b>Amostra 21</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	CA	Neg	Neg	GN	SM	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Neg	GN	SM	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CA	Neg	Neg	GN	SM	NE	
<i>Oxford</i>	CA	Neg	Neg	GN	SM	NE	
<b>Amostra 22</b>							
Enriquecimento primário							Negativo
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>Oxford</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	
<b>Amostra 23</b>							
Enriquecimento primário							Positivo
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
<b>Amostra 24</b>							
Enriquecimento primário							Positivo
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
Enriquecimento secundário							
<i>OAA</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	
<i>Oxford</i>	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; GN - Gram negativo; GP - Gram positivo; SM - sem mobilidade; CM - com mobilidade; NE - não efectuado; *L. m.* - *Listeria monocytogenes*.

Na amostra 21 verificou-se apenas o crescimento de colónias atípicas nos dois meios sólidos selectivos utilizados. Estas colónias não foram identificadas como *Listeria monocytogenes* após a realização dos testes bioquímicos. No caso da amostra 22 não se verificou mesmo qualquer crescimento nos dois meios sólidos.

Para o caso das amostras 23 e 24 as colónias típicas verificadas em meio *OAA* e *Oxford* que foram sujeitas aos testes bioquímicos, foram identificadas como *Listeria monocytogenes*.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos para as amostras da série E analisadas através do método VIDAS LMO2. Verificam-se os mesmos resultados obtidos pelo método de referência, ou seja as amostras 21 e 22 foram negativas para a presença de *Listeria monocytogenes* e as amostras 23 e 24 foram positivas.

**Tabela 18** - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 na série E.

Resultados do método VIDAS LMO2					
Amostra	Teste VIDAS <sup>®</sup> <i>Listeria monocytogenes</i> II		Confirmação		Resultado
	VT	Interpretação	<i>OAA</i>	API <i>Listeria</i>	
21	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
22	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
23	1,71	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo
24	1,67	Positivo	CT	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo

VT - valor de teste; CT – colónias típicas; NE – não efectuado.

As amostras 21 e 22 foram inoculadas com a bactéria, no entanto o VT obtido no teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II, para estas amostras, foi de 0,00. Estes resultados podem estar relacionados com o modo de inoculação que foi efectuada sem prévia recuperação dos microrganismos. A estirpe de referência utilizada na contaminação artificial encontrava-se no estado liofilizado e congelado, estando as células num estado fragilizado. Esta fragilidade pode também estar relacionada com o facto de a estirpe se encontrar próxima do final do período de validade e/ou por variabilidade das condições de conservação ( $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ).

De acordo com Dupon e Augustin (2009) as células fragilizadas podem apresentar dois tipos de comportamentos em meios de enriquecimento. Primeiro, as células fragilizadas tornam-se sensíveis aos componentes selectivos presentes no meio e aos quais apresentariam, normalmente, resistência. Algumas células podem não iniciar o seu crescimento no meio resultando numa ineficiente detecção do patogénico na amostra. Segundo, devido ao tempo de recuperação, as células fragilizadas apresentam uma fase de latência mais longa

comparativamente às bactérias saudáveis. Esta situação apresenta um grande risco de não ser alcançada a concentração bacteriana necessária para a sua detecção, dentro do tempo de duração da etapa de enriquecimento.

Para além do estado das células utilizadas na inoculação, existem outros factores que podem interferir no crescimento de *Listeria monocytogenes*. Nomeadamente características intrínsecas à matriz alimentar: tipo e carga microbiana, quantidade de nutrientes, pH (ao qual *Listeria monocytogenes* é sensível para pH ácido). Também factores extrínsecos podem interferir no crescimento de *L. monocytogenes*: tipo de tratamento a que o produto é sujeito durante o seu processamento e tempo e temperatura de exposição ao agente causador de stress celular.

### II.3.2. Controlos bacteriológicos

Foram realizados, em cada serie de análises, 4 controlos bacteriológicos: controlos de crescimento positivo e negativo, branco e controlo de especificidade.

O controlo de crescimento positivo foi realizado com uma cultura pura de *Listeria monocytogenes* (NCTC 11994). Permiteu analisar se os meios de cultura utilizados na pesquisa de *L. monocytogenes* oferecem as condições necessárias ao crescimento destas bactérias, para as quais se destinam.

O controlo de crescimento negativo foi efectuado em todos os meios de cultura utilizados e consistiu na inoculação dos mesmos com uma cultura pura de *Escherichia coli* (NCTC 9001). O controlo negativo permitiu aferir se os meios de cultura utilizados inibem de forma eficaz os microrganismos não alvo.

O branco permitiu obter um controlo das condições assépticas durante o ensaio, avaliando a ocorrência de contaminações externas (analista e ambiente) que poderiam ser introduzidas durante a sua realização.

O controlo de especificidade foi efectuado no meio OAA e nas galerias API *Listeria*. Utilizou-se para este controlo uma cultura pura de *Listeria innocua* (NCTC 11288) de modo a avaliar a capacidade do meio e das galerias API na diferenciação e identificação de *Listeria monocytogenes*.

A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos nos controlos efectuados, em todas as séries de análise, pelo método de referência. Como os resultados foram idênticos, em todas as séries, são apresentados apenas uma vez.

Verifica-se que todos os controlos apresentaram resultados conformes. O controlo positivo apresentou colónias características nos meios selectivos inoculados e que foram confirmadas como *Listeria monocytogenes*. Verificou-se ausência de crescimento nos controlos negativos,

indicando que todos os meios selectivos utilizados inibiram o crescimento de *Escherichia coli*. O branco não apresentou qualquer crescimento nos meios sólidos inoculados, indicando que os ensaios foram realizados em condições adequadas. O controlo de especificidade apresentou crescimento de colónias atípicas em OAA (colónias azuis sem halo opaco) que foram correctamente identificadas como *L. innocua* pelo sistema de identificação API *Listeria*.

**Tabela 19** - Resultados obtidos através do método de referência para os controlos das séries A a E.

Resultados do método ISO 11290-1								
Isolamento		Confirmação					Resultado Final	
Meio	Crescimento	Hemólise	Catalase	Coloração Gram	API M	API <i>Listeria</i>		
<b>Controlo de crescimento positivo</b>								
Enriquecimento primário								
OAA	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>	Positivo	
Oxford	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Enriquecimento secundário								
OAA	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
Oxford	CT	Pos	Pos	GP	CM	<i>L. m.</i>		
<b>Controlo de crescimento negativo</b>								
Enriquecimento primário								
OAA	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NA	
Oxford	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
Enriquecimento secundário								
OAA	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
Oxford	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
<b>Branco</b>								
Enriquecimento primário								
OAA	AC	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo	
Oxford	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
Enriquecimento secundário								
OAA	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
Oxford	AC	NE	NE	NE	NE	NE		
<b>Especificidade</b>								
OAA	CA <sup>(1)</sup>	NE	NE	NE	NE	<i>L. innocua</i>	NA	

AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; Pos - reacção positiva; GN – Gram negativo; CM – com mobilidade; NE - não efectuado; NA – não aplicável.

(1) colónias azul turquesa sem halo opaco.

Na Tabela 20 estão presentes os resultados obtidos nos controlos efectuados através do protocolo VIDAS LMO2.

Os controlos de crescimento positivos apresentaram valores de VT entre 1,12 e 2,07, sendo interpretado como um resultado positivo e confirmado como tal. Tanto o controlo de crescimento negativo como o branco apresentaram valores de VT de 0,00 sendo negativos para a presença de *Listeria monocytogenes*.

**Tabela 20** - Resultados obtidos através do método VIDAS LMO2 para os controlos das séries A a E

Resultados do método VIDAS LMO2					
Série	VT	Interpretação	Confirmação		Resultado
			OAA	API <i>Listeria</i>	
<b>Controlo de crescimento positivo</b>					
A	1,86	Positivo	CT	<i>L. m.</i>	Positivo
B	1,69	Positivo	CT	<i>L. m.</i>	Positivo
C	2,05	Positivo	CT	<i>L. m.</i>	Positivo
D	2,07	Positivo	CT	<i>L. m.</i>	Positivo
E	1,12	Positivo	CT	<i>L. m.</i>	Positivo
<b>Controlo de crescimento negativo</b>					
A	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
B	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
C	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
D	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
E	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
<b>Branco</b>					
A	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
B	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
C	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
D	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
E	0,00	Negativo	NE	NE	Negativo
<b>Especificidade</b>					
A a E	NA	NA	CA <sup>(1)</sup>	<i>L. innocua</i>	NA

VT – valor de teste; CA – colónias atípicas; CT - colónias típicas; NE - não efectuado; NA – não aplicável; *L. m.* – *Listeria monocytogenes*.

<sup>(1)</sup> verificou-se a presença de colónias azul turquesa sem halo opaco.

A obtenção de resultados conformes, em todos os controlos realizados em cada série, fornece confiança nos resultados obtidos nos ensaios efectuados. Os resultados dos controlos demonstram a adequabilidade dos meios de cultura e as boas condições ambientais e do material, bem como o bom desempenho do analista durante a realização dos ensaios.

### II.3.3. Parâmetros de desempenho do método

Os resultados finais obtidos em ambos os métodos foram emparelhados de modo a calcular o número de resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos. Com base nestes resultados foram calculados os 3 parâmetros de desempenho do método alternativo: exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa).

A Tabela 21 apresenta os resultados finais obtidos por ambos os métodos para todas as amostras analisadas. Verifica-se que todos os resultados foram concordantes entre ambos os procedimentos aplicados.

**Tabela 21** - Resultados finais obtidos por ambos os métodos na pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

Resultados finais do método ISO 11290-1 e do método VIDAS LMO2					
Amostra	ISO 11290-1	VIDAS LMO2	Amostra	ISO 11290-1	VIDAS LMO2
Série A			Série D		
1	Negativo	Negativo	16	Positivo	Positivo
2	Negativo	Negativo	17	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	18	Positivo	Positivo
4	Negativo	Negativo	19	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	20	Positivo	Positivo
Série B			Série E		
6	Negativo	Negativo	21	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	22	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	23	Positivo	Positivo
9	Negativo	Negativo	24	Positivo	Positivo
10	Negativo	Negativo			
Série C					
11	Negativo	Negativo			
12	Negativo	Negativo			
13	Negativo	Negativo			
14	Negativo	Negativo			
15	Negativo	Negativo			

A Tabela 22 apresenta os resultados emparelhados obtidos em ambos os métodos. Verificaram-se 7 resultados verdadeiros positivos, 17 resultados verdadeiros negativos e 0 desvios positivos e negativos.

**Tabela 22** - Resultados emparelhados de ambos os métodos.

	ISO 11290-1 Positivo	ISO 11290-1 Negativo
VIDAS LMO2 Positivo	Verdadeiro Positivo (VP) VP = 7	Desvio Positivo (DP) DP = 0
VIDAS LMO2 Negativo	Desvio Negativo (DN) DN = 0	Verdadeiro Negativo (VN) VN = 17

Adaptado de ISO 16140:2003

Na Tabela 23 encontram-se os resultados obtidos no cálculo dos três parâmetros de desempenho avaliados, bem como as suas fórmulas de cálculo. Observa-se que o método VIDAS LMO2 obteve um valor de 100 % para a exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa. Estes valores foram semelhantes aos obtidos pelo fabricante (exactidão relativa 99,1 %, sensibilidade relativa 99,4 % e especificidade relativa 98,8 %).

**Tabela 23** – Resultados da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade e sua fórmula de cálculo

<b>Cálculo da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa</b>		
Parâmetro	Fórmula de cálculo	Resultado
Exactidão relativa	$\frac{(VP + VN) \times 100}{N}$	100 %
Sensibilidade relativa	$\frac{VN \times 100}{N_-}$	100 %
Especificidade relativa	$\frac{VP \times 100}{N_+}$	100 %

VP, verdadeiro positivo; VN, verdadeiro negativo; N, número total de amostras; N<sub>-</sub>, número de resultados negativos com o método de referência; N<sub>+</sub>, número de resultados positivos com o método de referência.

---

---

## **III**

**Pesquisa de *Salmonella* spp.**

---

---

## III.1. INTRODUÇÃO

### III.1.1. Caracterização de *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* é composto por duas espécies: *Salmonella enterica* (*S. enterica*) e *Salmonella bongori* (*S. bongori*). *S. enterica* encontra-se dividida em 6 subespécies referidas com numeração romana e com um nome (Tabela 24) (Montville e Mathews, 2008).

#### III.1.1.1. Caracterização bioquímica

As bactérias do género *Salmonella* (vulgarmente designadas como salmonelas) pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram negativas em forma de bastonete, anaeróbias facultativas e não formam esporos. A maioria das salmonelas é móvel por flagelos, ocorrendo estirpes não móveis como resultado de flagelos disfuncionais e estirpes não flageladas (*Salmonella Enterica* sorovar Pullorum e Gallinarum) (Montville e Mathews, 2008).

A distinção das salmonelas dos restantes microrganismos é possível através de diversas reacções bioquímicas. As bactérias do género *Salmonella* metabolizam D-glucose com produção de ácido e gás, são oxidase e catalase negativa, descarboxilam lisina e ornitina, não fazem a hidrólise da ureia e produzem, geralmente, sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S) (Montville e Mathews, 2008).

#### III.1.1.2. Caracterização sorológica

Com base nos seus antígenos as salmonelas podem ser divididas em sorovares. As salmonelas possuem antígenos O (somáticos) de natureza lipopolissacarídica existentes na superfície exterior da membrana externa, antígenos H (flagelares) de natureza proteica e antígenos Vi (capsulares). Estes últimos ocorrem apenas nas sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Os testes sorológicos que permitem a identificação dos diferentes sorovares baseiam-se na aglutinação, através de anti-soro, das bactérias que possuem os antígenos dos anticorpos específicos (Bio-Rad, 2003; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). *S. enterica* inclui mais de 2, 443 sorovares e *S. bongori* 20 sorovares (Montville e Mathews, 2008) (Tabela 24).

**Tabela 24-** Subespécies e número de sorovares do género *Salmonella*.

<i>Salmonella</i> species and subspecies	No. of serovars
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1, 454
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12
<i>S. bongori</i> (V)	20
Total	2, 463

Adaptado de Montville e Mathews (2008).

### III.1.1.3. Condições de crescimento e sobrevivência

Algumas bactérias do género *Salmonella* conseguem crescer a temperaturas elevadas (acima dos 54 °C) e outras possuem características psicrotróficas que permitem o seu crescimento em produtos alimentares armazenados a 2 °C - 4 °C. A sua temperatura óptima de crescimento é de 37 °C. As salmonelas podem sobreviver durante longos períodos de tempo em alimentos congelados sendo a sua sobrevivência condicionada pela composição do alimento congelado, do estado fisiológico das bactérias presentes e da resposta específica de cada sorovar (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

As bactérias do género *Salmonella* têm capacidade de proliferar numa gama de pH entre 4.5 a 9.5 com um pH óptimo de crescimento entre 6.5 e 7.5. Dos diversos ácidos orgânicos e inorgânicos utilizados na acidificação dos produtos, o ácido acético tem um efeito bactericida mais acentuado dos outros ácidos associados aos alimentos, como o ácido láctico e o ácido cítrico. *Salmonella* não é capaz de se multiplicar em alimentos com  $a_w$  inferior a 0.93 e o seu crescimento é inibido na presença de 3 a 4 % de NaCl (Montville e Mathews, 2008).

### III.1.2. Reservatórios

As salmonelas encontram-se presentes no meio ambiente. As práticas de produção animal intensivas utilizadas nas indústrias da carne e dos produtos da pesca, a reciclagem de produtos dos matadouros para a alimentação animal e o comércio internacional de alimentos, têm contribuído para a forte presença destas bactérias na cadeia alimentar (ICMSF, 2000; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

Além da presença generalizada no meio ambiente, as salmonelas estão também presentes no tracto gastrointestinal de alguns animais fazendo parte da sua microflora nativa. *S. enterica* encontra-se presente, geralmente em pequenas quantidades, no tracto gastrointestinal de muitos mamíferos, aves e répteis. *Salmonella* pode tornar-se patogénica para estes animais se atingir valores populacionais elevados (Karsi *et al.*, 2008).

### III.1.3. Ambientes de processamento

As bactérias do género *Salmonella* podem entrar nas unidades de transformação através de animais saudáveis assintomáticos. Durante o processo de abate pode ocorrer contaminação cruzada, havendo transferência de *Salmonella* para carcaças que não se encontravam contaminadas (Karsi *et al.*, 2008).

Segundo Karsi *et al.* (2008), verificou-se um aumento da presença de *Salmonella*, de 19 % (antes do escaldão) para 36,9 % (após esfriamento), em carcaças de aves analisadas em 6 pontos do processo de abate. As salmonelas têm capacidade para aderir à pele das aves, conseguindo permanecer durante todo o seu processamento (Karsi *et al.*, 2008).

Jensen *et al.* (2006) estudaram a persistência de *S. enterica* sorovar Typhimurium em sistemas de produção de porco em regime extensivo. Agruparam animais não infectados com animais inoculados de modo a avaliar a transmissão da bactéria entre os animais. O estudo demonstrou que a infecção tem capacidade para se espalhar entre os animais e a bactéria consegue permanecer no meio ambiente, nomeadamente na água e na área de alimentação. Diversos estudos demonstraram que *Salmonella* pode persistir, também, em ambientes de produção intensiva de porcos durante vários meses e até mesmo durante anos (Jensen *et al.* 2006).

Os agentes patogénicos podem não interferir com o bem-estar dos animais. Contudo, os agentes zoonóticos como *S. enterica* podem ser, posteriormente, transmitidos para o ser humano através do consumo de carne contaminada (Jensen *et al.* 2006).

### III.1.4. Presença nos alimentos

A via oral é a única via de entrada das bactérias do género *Salmonella* no corpo humano, tornando os alimentos um importante veículo de transmissão (ICMSF, 2000).

A carne de aves e os ovos constituem as principais fontes de *Salmonella*. A contaminação da carne ocorre pela ingestão de alimentos ou de água contaminada e a contaminação do ovo surge devido à capacidade da bactéria (sorovar Enteritidis) para colonizar o tecido ovariano da

galinha. A transmissão do agente infeccioso para dentro do ovo ocorre antes da formação da casca. Deste modo, a viabilidade das células, que se encontram no interior do ovo, permanece inalterada após a aplicação de práticas de higienização à superfície do ovo (Clavijo *et al.*, 2006).

Apesar do importante papel da carne de aves e dos ovos na transmissão da bactéria, é necessário não desvalorizar outro tipo de fontes da bactéria, como a carne de porco e a carne de ovelha. Muitos surtos foram também associados ao consumo de tomates, sumo de laranja e vegetais. De facto, as frutas e os vegetais têm ganho uma importância cada vez maior como veículos de transmissão desta bactéria. A importação destes produtos de países com um clima tropical e subtropical, onde as práticas de produção, colheita e distribuição não cumprem muitas das vezes os critérios de higiene, contribuiu para esta situação. A contaminação de alimentos, embora pouco frequente, pode, também, ocorrer através de manipuladores portadores de *Salmonella* (com ou sem sintomas de doença) (Montville e Mathews, 2008).

Estudos de diversos surtos de origem alimentar indicam que a ingestão de um pequeno número de células de *Salmonella* pode ser infeccioso (Tabela 25). Os produtores, bem como os processadores e distribuidores, devem estar perfeitamente conscientes de que mesmo a presença de um baixo nível de *Salmonella* no produto acabado, pode levar a sérias consequências em termos de saúde pública (Doyle e Beuchat, 2007).

Nos critérios de segurança dos géneros alimentícios do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamentos N.º 1441/2007 e N.º 365/2010, é estabelecido a ausência de *Salmonella* em 25 g de qualquer produto que se destina ao consumo humano, colocados no mercado durante o seu período de vida útil. Nos mesmos regulamentos é estabelecida a ausência em 10 g no caso de carne picada e preparados de carne, excepto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados e para o caso de carne separada mecanicamente.

**Tabela 25** - Dose infectante de algumas sorovares de *Salmonella* em alguns produtos.

Dose infectante de <i>Salmonella</i> em diferentes produtos alimentares		
Produto	Sorovar	Dose infectante (UFC <sup>1</sup> )
Eggnog	Meleagridis	$10^6 - 10^7$
Eggnog	Anatum	$10^5 - 10^7$
Goat cheese	Zanzibar	$10^5 - 10^{11}$
Carmin dye	Cubana	$10^4$
Imitation ice cream	Typhimurium	$10^4$
Chocolate	Eastbourn	$10^2$
Hamburger	Newport	$10^1 - 10^2$
Cheddar cheese	Heidelberg	$10^2$
Chocolate	Napoli	$10^1 - 10^2$
Cheddar cheese	Typhimurium	$10^0 - 10^1$
Chocolate	Typhimurium	$\leq 10^1$
Paprika potato chips	Saint-Paul, Javiana, Rubislaw	$\leq 4.5 \times 10^1$
Alfafa sprouts	Newport	$\leq 4.6 \times 10^2$
Ice cream	Enteritidis	$\leq 2.8 \times 10^1$

<sup>1</sup>UFC, Unidade Formadora de Colónias.

Adaptado de Montville e Mathews (2008).

### III.1.5. Salmolenose

#### III.1.5.1. Etiologia

A maioria das salmonelas é patogénica para o homem (Shinohara *et al.*, 2008) e constituem os agentes etiológicos da salmonelose. Esta é uma das principais doenças de origem alimentar em todo o mundo (Clavijo *et al.*, 2006) que de acordo com a sintomatologia clínica e com o modo de difusão pode ser dividida em dois grupos: febres tifóide e paratifóide (causadas por *S. typhi* e *S. paratyphi*, respectivamente) e outras salmoneloses (causadas pelas outras salmonelas) (ICMSF, 2000).

A febre tifóide é normalmente transmitida através do consumo de água ou de alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas surgem após um período de incubação de 7 a 21 dias e podem incluir septicemia, febres altas, diarreia e vómitos. É de salientar que após a infecção os indivíduos podem tornar-se portadores da bactéria durante meses ou até anos, constituindo uma fonte contínua de infecção. Uma pequena percentagem dos doentes (1 a 3 %)

adquire mesmo um “estado de tolerância” em relação à bactéria, tornando-se portadores crônicos e eliminando o patogênico nas suas fezes (ICMSF, 2000; Shinohara *et al.*, 2008).

A febre paratifóide (ou febre entérica) constitui uma doença com sintomas mais brandos do que a febre tifóide que podem evoluir para septicemia e gastroenterite, febre e vômitos. O período de incubação é de 6 a 48 horas e a contaminação pode ser provocada pelo consumo de água ou de alimentos contaminados, sobretudo ovos, leite, mariscos e vegetais crus (Shinohara *et al.*, 2008).

As infecções causadas por outras salmonelas resultam numa infecção gastrointestinal que se caracteriza por diversos sintomas como dores abdominais, febre, vômitos e diarreia que surgem entre as 12 e as 36 horas após a ingestão da bactéria (ICMSF, 2000; Shinohara *et al.*, 2008). Estas infecções correspondem à manifestação mais comum provocada pelas bactérias do género *Salmonella* e, geralmente, não necessitam de tratamento com antibióticos (Shinohara *et al.*, 2008).

Recém-nascidos, crianças, idosos, e indivíduos com o sistema imunitário fragilizado, são mais susceptíveis às infecções por *Salmonella* do que os adultos saudáveis, constituindo, deste modo, os principais grupos de risco. O incompleto desenvolvimento do sistema imunitário nos recém-nascidos e nas crianças, as fracas ou tardias respostas imunitárias nos idosos e nas pessoas debilitadas e, geralmente, a baixa produção de ácido gástrico nas crianças e nos idosos, facilitam a colonização da bactéria nestas populações (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

### **III.1.5.2. Mecanismos de patogenicidade**

Embora os diversos sorovares de *Salmonella* difiram quanto à sua patogenicidade, a presença de qualquer um dos sorovares nos alimentos deve ser considerada como um perigo potencial para a saúde humana (ICMSF, 2000). *S. enterica* é o principal patogênico de origem alimentar em todo o mundo (Ohtsuka *et al.*, 2005), em particular a sorovar *S. enteritidis* que nas últimas décadas tem sido a causa predominante de salmonelose em diversos países (Clavijo *et al.*, 2005; Ohtsuka *et al.*, 2005; Shinohara *et al.*, 2008). *S. enteritidis* está associada sobretudo ao consumo de ovos contaminados e produtos derivados (Ohtsuka *et al.*, 2005; Doyle e Beuchat, 2007).

Os sintomas resultam da migração da bactéria da cavidade oral para os tecidos intestinais (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008). As bactérias atravessam a camada epitelial do intestino e alcançam a lâmina própria onde se multiplicam (Ohtsuka *et al.*, 2005). O

estabelecimento de uma infecção depende da capacidade da bactéria para colonizar as células intestinais (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Mathews, 2008).

### III.1.5.3. Epidemiologia

*Salmonella* spp. é um dos principais agentes causadores de doenças alimentares em todo o mundo (Clavijo *et al.*, 2005; Soyer *et al.*, 2009). Só nos Estados Unidos as infecções por *Salmonella* afectam, aproximadamente, 1.4 milhões de pessoas (Rall *et al.*, 2005).

Os principais surtos de salmonelose humana, das últimas décadas, são de grande interesse uma vez que salientam a vasta variedade de produtos alimentares e de sorovares implicados (Doyle e Beuchat, 2007).

Em Portugal, as doenças de declaração obrigatória provocadas por *Salmonella* spp., são divididas em febre tifóide e paratifóide e outras salmoneloses.

De acordo com os dados mais recentes (2008), foram notificados, em Portugal um total de 23 casos de febre tifóide e paratifóide e 347 casos de outras salmoneloses. Na Tabela 26 estão presentes os dados relativos ao número de casos, destas doenças, notificados em Portugal no período de 2004 a 2008, verificando-se uma diminuição da incidência de 2004 para 2008 (DGS, 2010).

**Tabela 26** - Número de casos de febre tifóide, paratifóide e outras salmoneloses no período de 2004 a 2008 em Portugal.

Número de casos de doenças causadas por <i>Salmonella</i> spp.										
Regiões e sub-regiões	Febre tifóide e paratifóide					Outras salmoneloses				
	2004	2005	2006	2007	2008	2004	2005	2006	2007	2008
Norte	21	19	11	6	4	243	250	224	239	161
Centro	34	22	17	8	7	34	31	37	34	31
Lisboa e vale do Tejo	2	30	13	15	8	199	161	123	136	114
Alentejo	1	4	5	4	-	43	53	8	24	21
Algarve	2	15	5	10	4	25	14	11	23	13
R. A. Açores	-	1	1	-	-	-	4	11	2	7
R. A. Madeira	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>Portugal</b>	<b>78</b>	<b>92</b>	<b>52</b>	<b>43</b>	<b>23</b>	<b>544</b>	<b>513</b>	<b>415</b>	<b>461</b>	<b>347</b>
Estrangeiro	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Adaptado de DGS (2010).

A Tabela 27 apresenta os dados relativos ao número de casos de febre tifóide e paratifoide de acordo com a faixa etária e género dos doentes. Observa-se que o número de casos de febre tifóide e paratifoide foi superior para as faixas etárias de 1 aos 4 anos e dos 5 aos 14 anos, não havendo grandes diferenças entre número de casos ocorridos em ambos os géneros. No caso de outras salmoneloses (Tabela 28) verifica-se claramente que as faixas etárias mais afectadas foram de 1 aos 4 anos (822 casos) e dos 5 aos 14 anos (899 casos). É de referir que para crianças com idade inferior a 1 ano de idade também se verificou um número de casos bastante superior (229 casos), quando comparado aos números de casos verificados nas faixas etárias acima dos 15 anos. Também se verifica que não houve uma grande diferença entre o número de casos ocorridos de acordo com o género dos doentes.

**Tabela 27** – Número de casos de febre tifóide e paratifoide por faixa etária e género no período de 2004 a 2008 em Portugal.

Grupos etários	2004		2005		2006		2007		2008		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<1	-	1	-	1	3	1	-	-	-	-	6
1 - 4	6	11	11	11	4	5	5	4	2	2	61
5 - 14	5	4	9	10	5	3	9	6	2	1	54
15 - 24	6	1	1	6	2	2	2	2	-	4	26
25 - 34	4	4	3	4	1	4	1	4	1	1	27
35 - 44	3	4	3	7	5	1	1	3	-	2	29
45 - 54	5	4	4	1	1	2	1	3	2	1	24
55 - 64	8	-	7	5	7	2	-	-	3	-	32
65 - 74	5	2	2	1	3	1	2	-	-	-	16
≥75	3	2	4	1	-	-	-	-	-	2	12
Ignorado	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	45	33	45	47	31	21	21	22	10	13	

Sendo: M – género masculino; F – género feminino. Adaptado de DGS (2010).

**Tabela 28** – Número de casos de outras salmoneloses por faixa etária e género no período de 2004 a 2008 em Portugal.

Grupos etários	2004		2005		2006		2007		2008		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<1	20	19	23	24	25	23	21	26	28	20	229
1 - 4	99	84	109	94	82	65	86	86	70	47	822
5 – 14	119	102	106	102	81	70	96	87	64	72	899
15 – 24	6	11	6	6	9	8	18	3	4	4	75
25 – 34	11	15	2	5	3	9	3	3	7	5	63
35 – 44	4	13	8	2	6	8	2	1	2	6	52
45 – 54	6	13	3	6	5	6	4	4	3	1	51
55 – 64	9	6	4	5	5	1	2	5	5	1	43
65 – 74	-	1	3	-	2	2	5	3	2	2	20
≥75	-	5	3	3	2	3	4	2	3	1	26
Ignorado	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	<b>275</b>	<b>269</b>	<b>267</b>	<b>247</b>	<b>220</b>	<b>195</b>	<b>241</b>	<b>220</b>	<b>188</b>	<b>159</b>	

Sendo: M – género masculino; F – género feminino. Adaptado de DGS (2010).

## III.2. MATERIAL E MÉTODOS

### III.2.1. Meios de cultura

Na execução do método de referência para a detecção de *Salmonella* spp. foram utilizados os meios de cultura mencionados na norma ISO 6579:2002. A referida norma indica a utilização de dois meios sólidos para cultura e identificação destas bactérias: *XLD* (*Xilose Lysine Deoxycholate agar*) e de um segundo meio sólido complementar. No presente estudo foram utilizados os meios sólidos *XLD* (*Bio-Rad*) e o meio cromogénico *SM2* (*ChromID<sup>TM</sup> Salmonella*, *bioMérieux*).

O protocolo VIDAS *Easy SLM* foi realizado com os meios de cultura propostos pelo fabricante. Foram utilizados os seguintes meios: *BPW* (*Buffered peptone water*, *Bio-Rad*) para o pré-enriquecimento não selectivo, *SX2* (*Salmonella Xpress S*, *bioMérieux*) para o enriquecimento selectivo e o meio cromogénico *SM2* (*bioMérieux*) para a etapa de confirmação do resultado.

### III.2.2. Amostras

Os produtos analisados para a pesquisa se *Salmonella* spp. foram os mesmos 24 produtos alimentares presentes na Tabela 4 (ver ponto II.2.2.). Cada produto representa uma amostra e as 24 amostras foram analisadas em 5 séries (séries A a E). As séries A a D foram constituídas por 5 amostras e a série E por 4 amostras, independentemente da sua categoria alimentar (Tabela 29). A letra foi conferida a cada série de acordo com a sua ordem cronológica de análise e a atribuição do número de amostra dentro de cada série de análise foi efectuada por ordem alfabética.

Dos 24 produtos analisados, 15 constituíam amostras de contaminação microbiológica desconhecida e 9 foram artificialmente contaminados com *Salmonella typhimurium* (*NCTC 12023*).

Dez produtos (amostras nº 1 a nº 10) pertenciam a 2 clientes do laboratório e os restantes 14 produtos foram adquiridos numa superfície comercial local. Em todos os casos, o tempo decorrido entre a aquisição e a análise dos produtos não ultrapassou as 12 horas.

**Tabela 29** - Produtos alimentares analisados, agrupados por série de análise e correspondente número de amostra.

Série	N.º Amostra	Produto alimentar	Tipo de amostra	
A	1	Paio 1	Contaminação microbiológica desconhecida	
	2	Paio 2		
	3	Paio 3		
	4	Paio 4		
	5	Paio 5		
B	6	Leite 1		
	7	Leite 2		
	8	Leite 3		
	9	Queijo Ovelha 1		
C	10	Queijo Ovelha 2		
	11	Chourição		
	12	Entremeada de porco fresca		
	13	Fiambre da pá		
	14	Moura		
D	15	Salsicha de porco fresca		
	16	Banana		Artificialmente contaminadas com <i>Salmonella typhimurium</i>
	17	Canja de galinha fresca		
	18	Carapau médio fresco		
	19	Chocolate de leite em barra		
20	Maçã Royal Gala			
E	21	Agrião embalado		
	22	Bacon embalado		
	23	Bola de Berlim		
	24	Leite embalado		

### III.2.3. Preparação das amostras

A preparação de cada uma das 24 amostras foi efectuada de acordo com as normas internacionais específicas da categoria do produto em questão. Para as carnes vermelhas e carnes brancas foram seguidas as indicações da norma ISO 6887-2: 2003, para produtos lácteos a ISO/FDIS 6887-5:2009 e para frutas e vegetais, produtos de pastelaria e produtos da pesca a norma ISO 6887-4:2003.

### III.2.4. Preparação da suspensão inicial

A suspensão inicial foi preparada através adição de 25 g / 25 ml de cada amostra a 225 ml de *BPW* (*Bio-Rad*).

### **III.2.5. Contaminação artificial das amostras**

Cada uma das amostras das séries D e E (total de 9 produtos) foram artificialmente contaminadas, no laboratório, com *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023).

A inoculação foi efectuada na suspensão inicial após a sua homogeneização (produtos sólidos) ou mistura (produtos líquidos). Após um período de repouso de 30 minutos a suspensão inicial foi incubada a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

### **III.2.6. Controlos bacteriológicos**

Em cada uma das cinco séries de análises, foram efectuados quatro controlos: os controlos de crescimento positivo e negativo, o branco e o controlo de especificidade.

#### **III.2.6.1. Controlo de crescimento positivo**

O controlo de crescimento positivo foi efectuado através da inoculação de uma cultura pura de *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023) em 225 ml de BPW. A partir desta suspensão inicial realizaram-se depois todas as restantes etapas dos procedimentos tal como se de uma amostra se tratasse.

#### **III.2.6.2. Controlo de crescimento negativo**

O controlo de crescimento negativo consistiu na inoculação de uma cultura pura de *Escherichia coli* (NCTC 9001) em todos os meios de cultura utilizados. Incluiu também a realização do teste VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella*.

#### **III.2.6.3. Branco**

O branco foi efectuado com uma amostra constituída unicamente por peptona salina estéril. Esta amostra foi submetida a todas as etapas dos procedimentos, tal como todas as restantes amostras.

#### III.2.6.4. Controlo de especificidade

O controlo de especificidade foi efectuado no meio *XLD* e no meio cromogénico *SM2* e nas galerias API 20 E (*bioMérieux*) (Apêndice II). Para este controlo foi utilizada uma cultura pura de *Escherichia coli* (*NCTC* 9001).

#### III.2.7. Detecção de *Salmonella* spp.

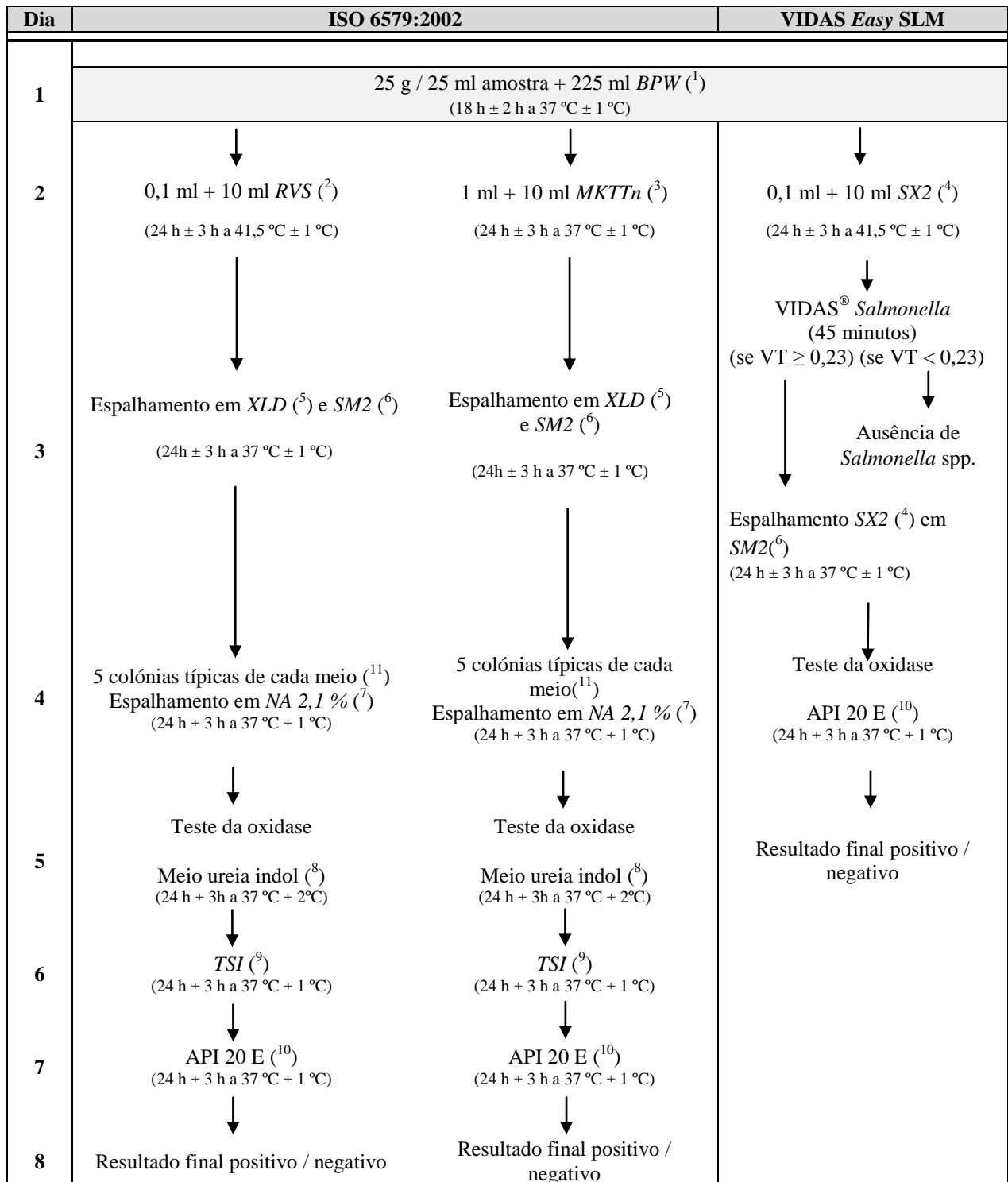
Cada uma das 24 amostras foi analisada simultaneamente de acordo com dois protocolos: o método de referência para a detecção de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002) e o protocolo VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* proposto pela *bioMérieux* para a detecção da mesma bactéria.

A etapa de pré-enriquecimento em meio não selectivo é comum a ambos os métodos executados. Deste modo, foram efectuadas as restantes etapas de cada método a partir da mesma cultura de pré-enriquecimento.

A Figura 15 apresenta esquematicamente as etapas destes dois métodos de ensaio, bem como o número de dias necessários à sua realização. O presente estudo foi efectuado em horário laboral de segunda-feira a sexta-feira, pelo que os dias constantes na figura não representam literalmente o número de dias dispendidos na execução dos ensaios.

##### III.2.7.1. Método de referência

O método de referência, efectuado neste estudo para a pesquisa de *Salmonella* spp., encontra-se descrito na norma ISO 6579:2002. O referido método prevê uma etapa de confirmação bioquímica e uma etapa de confirmação sorológica das colónias presuntivas do género *Salmonella*. Neste estudo foi apenas efectuada a etapa de confirmação bioquímica.



**Figura 15** - Representação esquemática dos métodos ISO 6579:2002 e VIDAS Easy SLM e número de dias necessários à sua realização. Sendo: <sup>(1)</sup> Meio líquido para o pré-enriquecimento não selectivo (*Buffered Peptone Water*, Bio-Rad); <sup>(2)</sup> meio líquido de enriquecimento selectivo (*Rappaport Vassiliadis Soja*, bioMérieux); <sup>(3)</sup> Meio líquido de enriquecimento selectivo (*Muller-Kauffmann*, bioMérieux); <sup>(4)</sup> Meio líquido de enriquecimento selectivo (*Salmonella Xpress S*, bioMérieux); <sup>(5)</sup> Meio sólido selectivo (*Xilose Lysine Deoxycholate agar*, bioMérieux); <sup>(6)</sup> Meio cromogénico (*chromID™ Salmonella*, bioMérieux); <sup>(7)</sup> Meio de cultura sólido para cultura de bactérias não fastidiosas (*2,1 % Nutrient Agar*, bioMérieux); <sup>(8)</sup> Meio para detecção da Urease, Indol e TDA (Meio ureia indol, bioMérieux); <sup>(9)</sup> Meio para caracterização bioquímica de enterobactérias (*Triple Sugar Iron*, Bio-Rad); <sup>(10)</sup> Sistema de identificação das *Enterobacteriaceae* (API 20 E, bioMérieux); <sup>(11)</sup> XLD, colónias rosas ou vermelhas com ou sem centro negro; SM2, colónias rosa pálido a roxo.

### III.2.7.2. Método alternativo

Paralelamente ao método de referência foi executado o protocolo VIDAS *Easy* SLM proposto pela *bioMérieux*.

O protocolo VIDAS *Easy* SLM engloba as seguintes etapas: pré-enriquecimento não selectivo, enriquecimento selectivo, teste rápido VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* (código de teste SLM) e confirmação dos resultados positivos do teste.

#### ▪ Enriquecimento selectivo

Após o pré-enriquecimento foram transferidos 0,1 ml desta suspensão para 10 ml de SX2. Esta nova suspensão foi incubada a  $41,5 \pm 1$  °C durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

#### ▪ Teste VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella*

Após o enriquecimento selectivo introduziu-se 0,5 ml desta suspensão no poço amostra da barrete de reagentes (Tabela 30). A barrete foi colocada no equipamento VIDAS *Heat & Go* onde o poço amostra é aquecido a  $131 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  durante 15 minutos  $\pm 1$  minuto. Após um período de arrefecimento, de pelo menos 10 minutos, a barrete foi colocada no equipamento *mini* VIDAS e todas as etapas seguintes foram realizadas automaticamente pelo equipamento até à saída do resultado.

A Tabela 31 apresenta o limiar do valor de teste (VT) a partir do qual o resultado é considerado como positivo pelo sistema.

**Tabela 30** - Composição da barrete de reagentes do teste VIDAS<sup>®</sup> SLM.

Poços	Reagentes
1	Poço amostra.
2	Tampão de pré-lavagem (400 µl): TRIS-NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante.
3, 4, 5, 7, 8, 9	Tampão de lavagem (600µl): TRIS-NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante.
6	Conjugado (400 µl): anticorpos anti- <i>Salmonella</i> marcados com fosfatase alcalina + conservante.
10	Cuvete de leitura com substrato (300 µl): 4-metil-umbeliferil-fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina* (DEA) (0,62 ml/l, ou seja, 6,6 %, pH 9,2) + conservante

\* Reagente irritante: R 36 – irritante para os olhos; S 26 – em caso de contacto com os olhos lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico.

Adaptado de *bioMérieux* (2009).

**Tabela 31** - Limiar e interpretação de VT para o teste VIDAS<sup>®</sup> SLM.

VIDAS <sup>®</sup> SLM	
VT	Interpretação
<0,23	Negativo
≥0,23	Positivo

Adaptado de *bioMérieux* (2008).

### ▪ Confirmação

Todos os resultados positivos foram sujeitos a confirmação e sempre nas 72 horas após o final da incubação do meio líquido selectivo *SX2*.

A confirmação foi realizada inoculando a superfície do meio cromogénico *SM2* a partir da suspensão de *SX2* (enriquecimento selectivo). A placa foi incubada a 37 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h. Após a incubação, 1 a 5 colónias características de *Salmonella* presentes na placa de *SM2* foram sujeitas a testes de confirmação bioquímica: teste da oxidase e sistema de identificação de *Enterobacteriaceae*, API 20 E.

### III.2.8. Parâmetros de desempenho do método

Cada uma das 24 amostras foi analisada pelos dois protocolos mencionados, produzindo um total de 48 resultados qualitativos (positivo / negativo). Estes resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o protocolo presente na norma de referência ISO 16140:2003.

Os resultados finais obtidos por ambos os métodos foram emparelhados de modo a obter os resultados falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN). Com base nestes resultados foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho do método: exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa. As fórmulas utilizadas para o cálculo destes parâmetros estão presentes na Tabela 8 (ver ponto II.2.8).

### III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi efectuado um estudo de comparação de métodos onde foram analisados 24 produtos alimentares. A análise foi executada através do método de referência ISO 6579:2002 e através do método alternativo VIDAS *Easy* SLM para detecção de *Salmonella* spp. . Os resultados obtidos por ambos os métodos foram emparelhados de modo a calcular os parâmetros de desempenho do método alternativo.

#### III.3.1. Análise microbiológica dos produtos alimentares

A análise foi efectuada em 5 séries, sendo 3 delas constituídas por amostras de contaminação microbiológica desconhecida e 2 constituídas por amostras artificialmente contaminadas com *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023) (ver Tabela 29, ponto III.2.2.).

Cada uma das amostras foi analisada simultaneamente pelos dois métodos. Uma vez que a etapa de pré-enriquecimento em meio não selectivo é comum a ambos os métodos, utilizou-se a mesma cultura de pré-enriquecimento a partir da qual foram efectuadas as restantes etapas de cada método (ver Figura 15, ponto III.2.7.).

##### III.3.1.1. Série A

A série A foi constituída por 5 paços (designados por amostras 1,2,3,4, e 5) do mesmo lote de fabrico, provenientes de um cliente do laboratório. Os resultados obtidos na análise destas amostras, através do método de referência, encontram-se na Tabela 32.

Verificou-se apenas o crescimento de colónias atípicas de *Salmonella* em todas as amostras e em ambos os meios de cultura sólidos utilizados. Cinco destas colónias (ou todas quando presentes em número inferior) foram sujeitas aos testes bioquímicos, após isolamento em NA 2,1 %.

O primeiro teste correspondeu à detecção da enzima citocromo oxidase das bactérias através do reagente Oxidase (*bioMérieux*). Esta enzima oxida o reagente fenilenediamina para formar um composto colorido violeta, o indofenol. As bactérias oxidase positivas revelam uma coloração violeta enquanto as bactérias oxidase negativas não revelam qualquer coloração, como é o caso de *Salmonella*.

**Tabela 32** - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série A.

Resultados do método ISO 6579:2002									
Isolamento		Confirmação						Resultado Final	
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20E		
<b>Amostra 1</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE		
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
<b>Amostra 2</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Pos	NC	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	CA	Pos	NE	NE	NE	NE	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Pos	NC	NE		
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Pos	NC	NE		
<b>Amostra 3</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
<b>Amostra 4</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE		
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE		
<b>Amostra 5</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Neg	NC	NE		

CA - colónias atípicas; Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; NC – comportamento não característico de *Salmonella*; NE - não efectuado.

Após o teste da oxidase foi efectuada a detecção da presença de uma urease, da produção de indol e de uma triptofano-desaminase (TDA) através do Meio ureia indol (*bioMérieux*). As bactérias do género *Salmonella* não possuem uma urease, não produzem indol e não possuem uma triptofano-desaminase. Após a realização destes testes, efectuou-se a inoculação do meio *TSI* (*Triple Sugar Iron, Bio-Rad*) que permite detectar a fermentação de glucose (com ou sem formação de gás), lactose e sacarose e a redução de sulfatos a sulfuretos que, na presença de

ferro, produz um precipitado preto de sulfureto de ferro. *Salmonella* faz a fermentação de glucose com produção de gás, é lactose e sacarose negativas e produz sulfureto de hidrogénio. Quando os resultados de todos estes testes foram compatíveis para *Salmonella*, foi realizado o último teste que corresponde às galerias API 20 E.

As colónias atípicas, verificadas nesta série de amostras, que foram submetidas aos testes bioquímicos não apresentaram resultados típicos de *Salmonella*. Todas as amostras foram portanto consideradas como negativas para a presença desta bactéria.

A Tabela 33 apresenta os resultados obtidos na análise das amostras da série A, através do método alternativo. Verifica-se que todas as amostras obtiveram um resultado negativo no teste VIDAS® *Salmonella* sendo por isso todas as amostras consideradas como negativas para a presença de *Salmonella* spp. .

**Tabela 33** - Resultados obtidos através do método VIDAS Easy SLM na série A.

Resultados do método VIDAS Easy SLM						
Amostra	Teste VIDAS® <i>Salmonella</i>		Confirmação			Resultado final
	VT	Interpretação	SM2	Oxidase	API 20 E	
1	0,06	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
2	0,05	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
3	0,05	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
4	0,06	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
5	0,05	Negativo	NE	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

### III.3.1.2. Série B

A série B foi constituída por 3 leites (amostras 6, 7 e 8) e por 2 queijos (amostras 9 e 10) provenientes directamente do produtor, o qual é cliente do laboratório. Os resultados obtidos, na análise destes produtos através do método de referência, estão presentes na Tabela 34.

Todas estas amostras apresentaram crescimento de colónias típicas (verificadas apenas em meio SM2) e de colónias atípicas de *Salmonella*.

O meio SM2 é constituído por 3 substratos cromogénicos que permitem a revelação de actividades enzimáticas específicas. A diferenciação de *Salmonella* (incluindo *Salmonella* lactose positiva) baseia-se na coloração espontânea de rosa pálido a roxo das colónias produtoras de esterase (Figura 16), desenvolvendo outros microrganismos cores diferentes. O crescimento de bactérias Gram positivas e de leveduras é inibido através de uma mistura selectiva que faz

parte da composição do meio. As colónias características de *Salmonella* obtidas nas amostras desta série não foram identificadas como tal, após a realização dos testes bioquímicos, representando colónias falsas positivas. Esta situação não é inédita, nem totalmente surpreendente, uma vez que a ocorrência de colónias falsas positivas em meios cromogénicos é referido por vários autores.

**Tabela 34** - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série B.

Resultados do método ISO 6579:2002								
Isolamento		Confirmação						Resultado Final
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20 E	
<b>Amostra 6</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Pos	NC	NE	
<b>Amostra 7</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Pos	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	NC	NE	
<b>Amostra 8</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	
<b>Amostra 9</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	
<b>Amostra 10</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Pos	Pos	Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Neg	Pos/Pos	NC	NE	

CA - colónias atípicas; CT – colónias típicas, Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; NC – comportamento não característico de *Salmonella*; NE - não efectuado.

Rall *et al.* (2005) avaliaram o desempenho de 5 meios de cultura sólidos selectivos (2 meios cromogénicos e 3 meios clássicos) na detecção de *Salmonella* em carcaças de aves. Observaram que apenas 21 % das colónias características obtidas no meio cromogénico *Rambach* foram confirmadas como *Salmonella* e 55 % com o outro meio cromogénico avaliado (*CHROMagar Salmonella*).

Nenhuma das colónias atípicas observadas e submetidas aos testes bioquímicos, foi identificada como pertencente ao género *Salmonella*.



**Figura 16** – Placa de SM2 inoculada com *Salmonella typhimurium*.

A Tabela 35 apresenta os resultados obtidos, para as amostras da série B, através do método VIDAS *Easy SLM*. Verifica-se que todas as amostras obtiveram um resultado negativo para a presença de *Salmonella* no teste VIDAS<sup>®</sup> SLM, sendo por isso considerada ausência de *Salmonella* spp. nestas amostras.

**Tabela 35** - Resultados obtidos através do método VIDAS *Easy SLM* na série B

Resultados do método VIDAS <i>Easy SLM</i>						
Amostra	Teste VIDAS <sup>®</sup> <i>Salmonella</i>		Confirmação			Resultado final
	VT	Interpretação	SM2	Oxidase	API 20 E	
6	0,10	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
7	0,09	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
8	0,09	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
9	0,13	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
10	0,08	Negativo	NE	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

### III.3.1.3. Série C

A série C foi constituída por chourição (amostra 11), entremeada de porco fresca (amostra 12), fiambre da pá (amostra 13), moura (amostra 14) e salsicha de porco fresca (amostra 15). Todos estes produtos foram adquiridos numa superfície comercial local e analisados no dia da sua aquisição. A Tabela 36 apresenta os resultados obtidos, através do método de referência, na análise destas 5 amostras. Verificou-se a presença de colónias atípicas em todas as amostras e as amostras 12, 14 e 15 apresentaram também colónias características de *Salmonella*. Estas colónias típicas verificaram-se tanto em *SM2* como em *XLD*.

O meio *XLD* constitui um meio para o isolamento selectivo de *Salmonella*. As colónias destas bactérias apresentam-se com uma coloração rosa ou vermelha (por descarboxilação da lisina), com ou sem centro negro (produção de  $H_2S$ ) (Figura 17).

A presença de colónias falsas positivas em *XLD* é também descrita por Rall *et al.* (2005). Estes autores avaliaram o desempenho de 3 meios selectivos tradicionais na detecção de *Salmonella* em carcaças de aves, *XLD*, *Salmonella-Shigella* (*SS* Agar) e *Brilliant Green Agar* (*BGA*). Segundo os mesmos autores nos meios de cultura tradicionais, *Salmonella*, *Proteus* e *Citrobacter* apresentam colónias semelhantes. Devido à sua presença comum em produtos alimentares, podem ocorrer nestes meios um elevado número de colónias falsas positivas. Por isso é tão importante a realização de testes bioquímicos a fim de obter a identificação do microrganismo presente.



**Figura 17** – Placa de *XLD* inoculada com *Salmonella typhimurium*.

**Tabela 36** - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série C.

Resultados do método ISO 6579:2002								
Isolamento		Confirmação						Resultado Final
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20 E	
<b>Amostra 11</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
<b>Amostra 12</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Pos/Pos	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Pos/Neg	NE/Neg	NE/Pos	NE/Neg	NE/NC	NE	
<b>Amostra 13</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
<b>Amostra 14</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
<b>Amostra 15</b>								
Enriquecimento <i>RVS</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA	Neg	Neg	Pos	Neg	NC	NE	
Enriquecimento <i>MKTTn</i>								
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Pos	NC	NE	Negativo
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Pos	Pos/Pos	Neg/Neg	NC	NE	

CA - colónias atípicas; CT – colónias típicas, Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; NC – comportamento não característico de *Salmonella*; NE - não efectuado.

Todas as colónias típicas e atípicas verificadas e submetidas aos testes de confirmação bioquímica não foram identificadas como *Salmonella* spp. . Todas as amostras desta série foram então consideradas negativas para a presença desta bactéria.

A Tabela 37 apresenta os resultados obtidos através do método VIDAS *Easy SLM* na análise das amostras da série C. Obteve-se um resultado negativo no teste VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* para todas as amostras, sendo por isso consideradas como amostras negativas para a presença de *Salmonella*.

**Tabela 37** - Resultados obtidos através do método VIDAS *Easy SLM* na série C.

Resultados do método VIDAS <i>Easy SLM</i>						
Amostra	Teste VIDAS <sup>®</sup> <i>Salmonella</i>		Confirmação			Resultado final
	VT	Interpretação	SM2	Oxidase	API 20 E	
11	0,08	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
12	0,07	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
13	0,08	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
14	0,08	Negativo	NE	NE	NE	Negativo
15	0,08	Negativo	NE	NE	NE	Negativo

VT - valor de teste; NE - não efectuado.

As três primeiras séries de análise foram constituídas por um total de 15 amostras de contaminação microbiológica desconhecida. Apesar de se terem observado o crescimento de algumas colónias características de *Salmonella*, não foram identificadas como tal. Não foram observadas colónias falsas negativas com nenhum dos meios sólidos utilizados.

A ausência de *Salmonella* nestas 15 amostras está de acordo com os critérios de segurança dos géneros alimentícios definidos no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamentos N.º 1441/2007 e N.º 365/2010.

#### III.3.1.4. Série D

A série D foi constituída por 5 produtos adquiridos numa superfície comercial local: banana (amostra 16), canja de galinha fresca (amostra 17), carapau médio fresco (amostra 18), chocolate de leite em barra (amostra 19) e maçã Royal Gala (amostra 20). Todos estes produtos foram analisados no dia da sua aquisição e foram artificialmente contaminados com *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023).

A Tabela 38 contém os dados obtidos após a análise das amostras da série D através do método ISO 6579:2002. Observa-se que, tal como era espectável, todas as amostras apresentaram crescimento de colónias típicas de *Salmonella*. Observou-se também o crescimento de colónias atípicas em todas as amostras, excepto na amostra 20.

**Tabela 38** - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série D.

Resultados do método ISO 6579:2002									
Isolamento		Confirmação						Resultado final	
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20 E		
<b>Amostra 16</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 17</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 18</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 19</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 20</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		

CA - colónias atípicas; CT – colónias típicas, Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; C – comportamento característico de *Salmonella*; NE - não efectuado; *S. spp.* – *Salmonella* spp. .

Entre 1 a 5 destas colónias típicas e atípicas, de cada placa de meio sólido selectivo, foram sujeitas aos testes bioquímicos. As colónias características foram identificadas como *Salmonella* spp. enquanto as colónias atípicas não. Todas as amostras apresentaram um resultado final positivo para a presença de *Salmonella* spp. .

A Tabela 39 apresenta os resultados obtidos através da análise das amostras da série D pelo método alternativo. Verifica-se que todas as amostras obtiveram um resultado positivo no teste VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* com VT entre 2,80 e 3,02. Todas as amostras apresentaram um resultado final positivo.

**Tabela 39** - Resultados obtidos através do método VIDAS *Easy SLM* na série D.

Resultados do método VIDAS <i>Easy SLM</i>						
Amostra	Teste VIDAS <sup>®</sup> <i>Salmonella</i>		Confirmação			Resultado final
	VT	Interpretação	SM2	Oxidase	API 20 E	
16	2,96	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
17	2,80	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
18	3,02	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
19	2,91	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
20	2,99	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo

VT - valor de teste; CT – colónias típicas; Neg – reacção negativa; NE - não efectuado.

### III.3.1.5. Série E

A série E constituiu a última série de amostras analisadas neste estudo e foi composta por 4 produtos alimentares adquiridos num supermercado local: agrião embalado (amostra 21), bacon embalado (amostra 22), bola de berlim (amostra 23) e leite embalado (amostra 24). Os produtos adquiridos foram analisados no dia da sua aquisição e foram artificialmente contaminados com *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023).

A Tabela 40 apresenta os resultados obtidos na análise destes 4 produtos pelo método de referência. Tal como seria espectável todas as amostras apresentaram crescimento de colónias típicas que foram confirmadas como *Salmonella* spp. . Para além destas colónias, as amostras 21 e 23, apresentaram também crescimento de colónias atípicas não identificadas como *Salmonella* spp. .

**Tabela 40** - Resultados obtidos através do método ISO 6579:2002 na série E.

Resultados do método ISO 6579:2002									
Isolamento		Confirmação						Resultado final	
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20 E		
<b>Amostra 21</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 22</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 23</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CA / CT	Neg/Neg	Pos/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	NE/C	NE/ <i>S. spp.</i>		
<b>Amostra 24</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		

CA - colónias atípicas; CT – colónias típicas, Neg - reacção negativa; Pos - reacção positiva; C – comportamento característico de *Salmonella*; NE - não efectuado; *S. spp.* – *Salmonella* spp. .

Na Tabela 41 estão apresentados os resultados obtidos através do método VIDAS *Easy* SLM na análise das amostras da série E. Verifica-se que todas as amostras apresentaram um resultado positivo para a presença de *Salmonella*. Este resultado é claramente evidente pelo VT obtido no teste VIDAS® *Salmonella* que foi bastante superior ao limite de detecção (0,23).

**Tabela 41** - Resultados obtidos através do método VIDAS *Easy* SLM na série E.

Resultados do método VIDAS <i>Easy</i> SLM						
Amostra	Teste VIDAS® <i>Salmonella</i>		Confirmação			Resultado final
	VT	Interpretação	SM2	Oxidase	API 20 E	
21	2,86	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
22	2,87	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
23	1,71	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo
24	1,67	Positivo	CT	Neg	<i>Salmonella</i> . spp.	Positivo

VT - valor de teste; CT – colónias típicas; Neg – reacção negativa; NE - não efectuado.

### III.3.2. Controlos bacteriológicos

Foram realizados 4 controlos bacteriológicos diferentes em cada série de análises: controlo de crescimento positivo e negativo, controlo de especificidade e branco.

O controlo de crescimento positivo foi realizado com uma cultura pura de *Salmonella typhimurium* (NCTC 12023). Permiteu analisar se os meios de cultura utilizados na pesquisa de *Salmonella* oferecem as condições necessárias ao crescimento destas bactérias e para as quais se destinam.

O controlo de crescimento negativo foi efectuado em todos os meios de cultura líquidos utilizados e consistiu na inoculação dos mesmos com uma cultura pura de *Escherichia coli* (NCTC 9001). O controlo negativo permitiu aferir se os meios de cultura utilizados inibem de forma eficaz os microrganismos não alvo.

O branco, efectuado através de uma amostra composta por peptona salina estéril, permitiu obter um controlo das condições assépticas durante o ensaio, avaliando a ocorrência de contaminações externas introduzidas quer pelo analista quer pelo ambiente.

O controlo de especificidade foi efectuado nos meios *XLD* e *SM2* e nas galerias API 20 E. Utilizou-se para este controlo uma cultura pura de *Escherichia coli* (NCTC 9001) de modo a avaliar se os meios permitem a diferenciação das colónias destas bactérias das colónias de *Salmonella*. Com a utilização deste controlo nas galerias API, pretendeu-se avaliar a qualidade do sistema na correcta identificação de *Escherichia coli*.

A Tabela 42 apresenta os resultados obtidos nos controlos efectuados, em todas as séries de análise, pelo método de referência. Como os resultados foram idênticos, em todas as séries, são apresentados apenas uma vez.

O controlo positivo apresentou colónias características nos meios sólidos selectivos inoculados e as mesmas foram confirmadas como *Salmonella*. Verificou-se a ausência de crescimento no controlo negativo, assegurando que os meios líquidos de enriquecimento selectivo utilizados inibiram o crescimento da cultura pura inoculada (*E. coli*). O branco não apresentou qualquer crescimento nos meios sólidos inoculados, indicando que os ensaios foram realizados em condições adequadas e que o material utilizado também apresentava as condições apropriadas. O controlo de especificidade apresentou crescimento de colónias atípicas em *XLD* (Figura 18) e em *SM2* (Figura 19) que, após os testes bioquímicos, foram correctamente identificadas como *E. coli*.

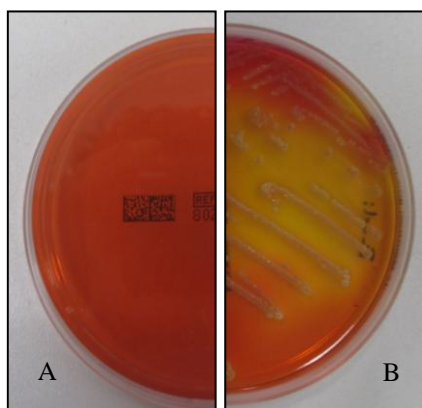
**Tabela 42** - Resultados obtidos através do método de referência para os controlos das séries A a E.

Resultados do método ISO 6579:2002									
Isolamento		Confirmação						Resultado Final	
Meio	Colónias	Oxidase	Urease	Indol	TDA	TSI	API 20 E		
<b>Controlo de crescimento positivo</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>	Positivo	
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<i>SM2</i>	CT	Neg	Neg	Neg	Neg	C	<i>S. spp.</i>		
<b>Controlo de crescimento negativo</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NA	
<i>SM2</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
<i>SM2</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
<b>Branco</b>									
Enriquecimento <i>RVS</i>									
<i>XLD</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Negativo	
<i>SM2</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
Enriquecimento <i>MKTTn</i>									
<i>XLD</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
<i>SM2</i>	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE		
<b>Especificidade</b>									
<i>XLD</i>	CA <sup>(1)</sup>	NE	NE	NE	NE	NE	<i>E. coli</i>	NA	
<i>SM2</i>	CA <sup>(2)</sup>	NE	NE	NE	NE	NE	<i>E. coli</i>		

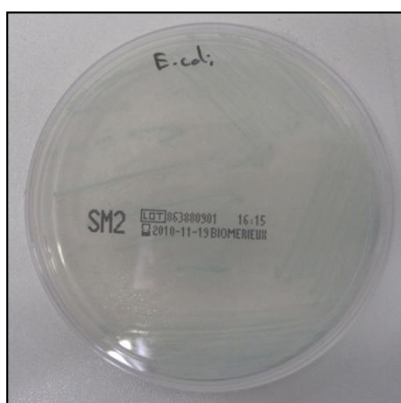
AC - ausência de crescimento; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; C – comportamento característico de *Salmonella*; NE - não efectuado; NA – não aplicável; *S. spp.* – *Salmonella* spp. .

<sup>(1)</sup> verificou-se a presença de colónias amarelas.

<sup>(2)</sup> verificou-se a presença de colónias azuis.



**Figura 18** – Meio sólido selectivo *XLD*: (A) placa de não inoculada; (B) placa inoculada com *Escherichia coli*.



**Figura 19** – Placa de *SM2* inoculada com *Escherichia coli*.

A Tabela 43 apresenta os resultados obtidos nos controlos efectuados através do protocolo VIDAS *Easy SLM*.

Os controlos de crescimento positivo, das 5 séries, apresentaram valores de VT entre 2,63 e 3,20 sendo interpretados pelo sistema como resultados positivos, para a presença de *Salmonella* spp., e foram confirmados como tal. Tanto o controlo de crescimento negativo como o branco apresentaram valores de VT de 0,00 sendo considerados negativos para a presença de *Salmonella* spp. .

**Tabela 43** - Resultados obtidos através do método VIDAS Easy SLM para os controlos das séries A a E.

Resultados do método VIDAS Easy SLM					
Série	VT	Interpretação	Confirmação		Resultado
			SM2	API 20 E	
<b>Controlo de crescimento positivo</b>					
A	2,97	Positivo	CT	<i>S. spp.</i>	Positivo
B	2,63	Positivo	CT	<i>S. spp.</i>	Positivo
C	3,02	Positivo	CT	<i>S. spp.</i>	Positivo
D	3,20	Positivo	CT	<i>S. spp.</i>	Positivo
E	2,81	Positivo	CT	<i>S. spp.</i>	Positivo
<b>Controlo de crescimento negativo</b>					
A	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
B	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
C	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
D	0,09	Negativo	NE	NE	Negativo
E	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
<b>Branco</b>					
A	0,07	Negativo	NE	NE	Negativo
B	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
C	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
D	0,09	Negativo	NE	NE	Negativo
E	0,08	Negativo	NE	NE	Negativo
<b>Especificidade</b>					
A a E	NA	NA	CA (1)	<i>E. coli</i>	NA

VT – valor de teste; CA - colónias atípicas; CT - colónias típicas; NE - não efectuado; NA – não aplicável; *L. m.* – *Listeria monocytogenes*.

(1) colónias azul turquesa sem halo opaco.

A obtenção de resultados conformes, em todos os controlos realizados em cada série, fornece confiança nos resultados obtidos na análise das amostras. Estes resultados demonstram a adequabilidade dos meios de cultura utilizados, as boas condições ambientais e do equipamento, bem como o bom desempenho do analista durante a realização dos ensaios.

### III.3.3. Parâmetros de desempenho do método

Os resultados finais obtidos em ambos os métodos foram emparelhados de modo a calcular o número de resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos. Com base nestes resultados foram calculados os 3 parâmetros de desempenho do método alternativo: exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa).

A Tabela 44 apresenta os resultados finais obtidos pelos dois métodos para cada uma das 24 amostras analisadas. Verificou-se que, para todas as amostras, os resultados obtidos foram concordantes não ocorrendo desvios positivos nem desvios negativos.

**Tabela 44** – Resultados finais obtidos por ambos os métodos na pesquisa de *Salmonella*.

Resultados finais do método ISO 6579:2002 e do método VIDAS Easy SLM					
Amostra	ISO 6579:2002	VIDAS SLM	Amostra	ISO 6579:2002	VIDAS Easy SLM
Série A			Série D		
1	Negativo	Negativo	16	Positivo	Positivo
2	Negativo	Negativo	17	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	18	Positivo	Positivo
4	Negativo	Negativo	19	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	20	Positivo	Positivo
Série B			Série E		
6	Negativo	Negativo	21	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	22	Positivo	Positivo
8	Negativo	Negativo	23	Positivo	Positivo
9	Negativo	Negativo	24	Positivo	Positivo
10	Negativo	Negativo			
Série C					
11	Negativo	Negativo			
12	Negativo	Negativo			
13	Negativo	Negativo			
14	Negativo	Negativo			
15	Negativo	Negativo			

A Tabela 45 apresenta os resultados emparelhados obtidos em ambos os métodos. Verificaram-se 9 resultados verdadeiros positivos, 15 resultados verdadeiros negativos e 0 desvios positivos e negativos.

**Tabela 45** - Resultados emparelhados de ambos os métodos.

	ISO 6579:2002 Positivo	ISO 6579:2002 Negativo
VIDAS Easy SLM Positivo	Verdadeiro Positivo (VP) VP = 9	Desvio Positivo (DP) DP = 0
VIDAS Easy SLM Negativo	Desvio Negativo (DN) DN = 0	Verdadeiro Negativo (VN) VN = 15

A Tabela 46 apresenta os resultados obtidos no cálculo dos três parâmetros de desempenho avaliados, bem como as suas fórmulas de cálculo. Observa-se que o método VIDAS Easy SLM obteve um valor de 100 % para a exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa.

**Tabela 46** - Resultados da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa do protocolo VIDAS *Easy SLM* e sua fórmula de cálculo.

Cálculo da exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa		
Parâmetro	Fórmula de cálculo	Valor percentual
Exactidão relativa	$\frac{(VP + VN) \times 100}{N}$	100
Sensibilidade relativa	$\frac{VN \times 100}{N_-}$	100
Especificidade relativa	$\frac{VP \times 100}{N_+}$	100

VP, verdadeiro positivo; VN, verdadeiro negativo; N, número total de amostras; N<sub>-</sub>, número de resultados negativos com o método de referência; N<sub>+</sub>, número de resultados positivos com o método de referência.

Os valores obtidos para a exactidão, especificidade e selectividade relativas obtidas, neste estudo, foram semelhantes aos obtidos pelo fabricante. O mesmo procedimento já se encontra validado pela marca (*bioMérieux*) que obteve uma exactidão relativa de 99,0 %, uma especificidade relativa de 99,1 % e uma sensibilidade relativa de 99,0 %.

---

---

# **IV**

## **Considerações Finais**

---

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O referencial normativo NP EN ISO / IEC 17025 apresenta os requisitos gerais de competência para os laboratórios de ensaio e de calibração, fazendo a validação de métodos analíticos parte destes requisitos.

A validação de métodos é uma condição importante nas análises microbiológicas, de forma a proporcionar confiança nos resultados obtidos pelo método. Muitas decisões são tomadas com base em resultados analíticos e podem ter um forte impacto, quer na economia, quer ao nível da saúde pública. A ocorrência de resultados falsos positivos pode conduzir à rejeição, desnecessária de lotes de produtos alimentares e à inquietação desnecessária do público, lesando a reputação do fabricante e conduzindo à perda de clientes. Por outro lado, os resultados falsos negativos podem comprometer a saúde pública, expondo a população a produtos alimentares contaminados (Eurachem, 2002; Lightfoot e Maier, 2003).

*Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. constituem dois importantes agentes de doenças de origem alimentar ([www.who.int/en](http://www.who.int/en); Lee *et al.*, 2009), tornando extremamente importante a rápida e eficiente monitorização da sua presença nos produtos alimentares, principalmente nos mais susceptíveis. Está definida nos critérios de segurança dos géneros alimentícios do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, e nas suas actualizações Regulamento N.º 1441/2007 e N.º 365/2010, a ausência destas duas bactérias, em 25 g do produto.

Os métodos de referência para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. são métodos fastidiosos, extensos e dispendiosos. Existem no mercado diversos métodos alternativos mais rápidos, mais económicos e de fácil execução, nomeadamente métodos imunológicos que se baseiam na formação de um complexo antigénio-anticorpo. Os protocolos VIDAS LMO2 e VIDAS Easy SLM são dois exemplos de métodos que incorporam testes imunológicos rápidos, teste VIDAS *Listeria monocytogenes* II e teste VIDAS *Salmonella* respectivamente, automatizados nos equipamentos VIDAS (*bioMérieux*).

O presente estudo foi conduzido no laboratório de microbiologia (MICROB) do Centro Tecnológico das Indústrias do Couro, em Alcanena. O referido laboratório encontra-se, actualmente, em processo de acreditação para a análise microbiológica dos géneros alimentícios para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. .

O estudo desenvolvido abrangeu a validação interna dos protocolos VIDAS LMO2 e VIDAS Easy SLM através de um estudo de comparação de métodos. Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi efectuado o estudo de comparação entre o protocolo VIDAS LMO2 e o

método ISO 11290-1:1996 incluindo a sua actualização ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. o estudo de comparação de métodos foi efectuado entre o protocolo VIDAS *Easy* SLM e o método de referência ISO 6579:2002.

A validação é um processo muito importante para demonstrar que o método é adequado ao fim pretendido, devendo o seu desempenho ser, pelo menos, equivalente ao desempenho do método de referência. Foram calculados, neste estudo, os seguintes parâmetros de desempenho dos métodos: exactidão relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa.

Todos os resultados obtidos, para as 24 amostras analisadas, foram concordantes entre os métodos VIDAS LMO2 / ISO 11290-1 e VIDAS *Easy* SLM / ISO 6579:2002, obtendo-se uma exactidão, especificidade e sensibilidade relativas de 100 % em ambas as situações. Estes resultados foram semelhantes aos valores de desempenho do método obtidos pelo fabricante: VIDAS LMO2 - exactidão relativa 99,1 %; sensibilidade relativa 99,4 %; especificidade relativa 98,8 % e VIDAS *Easy* SLM - exactidão, especificidade e sensibilidade relativas de 99,9%.

Ambos os procedimentos analisados tiveram um desempenho semelhante ao do método de referência. Significando que os métodos se encontram adequados à utilização de rotina pretendida.

Os testes VIDAS® *Listeria monocytogenes* II e VIDAS® *Salmonella* são testes rápidos que fornecem uma resposta ao fim de alguns minutos apenas: 70 minutos e 45 minutos, respectivamente. Contudo, antes da realização dos testes no equipamento *mini* VIDAS, são necessárias 2 etapas de enriquecimento que, devido ao tempo necessário para a multiplicação dos microrganismos presentes, se revelam as etapas mais longas de todo o procedimento. Ainda assim, os métodos validados revelaram-se métodos mais rápidos do que os métodos de referência. Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* os resultados positivos são obtidos ao fim de 3 dias utilizando o protocolo VIDAS LMO2, enquanto são necessários 5 a 7 dias para obter os mesmos resultados através do método de referência. Os resultados negativos são obtidos ao fim de 2 dias através do método VIDAS LMO2 e ao fim de 2 a 7 dias utilizando o método de referência. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. os resultados positivos são alcançados ao fim de 4 dias através do método VIDAS *Easy* SLM e ao fim de 7 dias com o método de referência. O protocolo VIDAS *Easy* SLM permite obter resultados negativos ao fim de 2 dias enquanto o método de referência permite obter os mesmos resultados entre 3 a 7 dias.

Para além da rapidez, estes procedimentos alternativos são menos dispendiosos, não só em relação aos consumíveis, mas também em relação à ocupação dos equipamentos e ao tempo gasto na preparação de meios de cultura no laboratório.

Existe, no entanto, uma limitação à utilização destes testes que está relacionada com a sensibilidade do método. O equipamento *mini* VIDAS possui um valor (VT) limiar para cada

teste, abaixo do qual o resultado é considerado negativo. Na amostra número 17, analisada neste estudo, obteve-se um resultado negativo, através do teste VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II, uma vez que os valores de VT obtidos (0,02 e 0,03) situavam-se abaixo do limiar de detecção (0,05). Contudo a mesma amostra obteve um resultado positivo quando analisada pelo método de referência. No caso desta amostra o método alternativo não detectou a bactéria quando esta estava, efectivamente, presente. Tratando-se de um resultado discordante foi efectuada a etapa de confirmação deste resultado (de acordo com o método alternativo) após a qual se considerou um resultado final positivo.

Face ao exposto considera-se que o equipamento *mini* VIDAS, presente no MICROB, se adequa ao fim pretendido e que o laboratório dispõe das condições necessárias à adequada realização dos métodos alternativos para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. em alimentos destinados ao consumo humano.

---

---

## **Bibliografia**

---

---

---

## BIBLIOGRAFIA

Afnor Validation, (2008). Validation Certificate For Alternative Analytical Method According To Standard EN ISO 16140:2003, VIDAS Listeria monocytogenes II (VIDAS LMO2) – Ref 30704. Certificate No.: BIO 12/11 – 03/04, Afnor Certification.

Afnor Validation, (2009). Validation Certificate For Alternative Analytical Method According To Standard EN ISO 16140:2003, VIDAS Salmonella. Certificate No.: BIO 12/16 – 09/05, Afnor Certification.

Almeida G. N., Gibbs P. A., Hogg T. A., Teixeira P. C. : **Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection.** *BMC Infectious Diseases* 2006, **6**:153.

Bio-Rad., 10/2003 code: 18298 - A4. Folheto Informativo - REF 60 781, Antiserum Salmonella Omnivalent OMNI-O (A-60).

Bio-Rad., 09/2003 code: 18313 - A4. Folheto Informativo - REF 60 781, Antiserum Salmonella: Determinação do Serotipo de Salmonella.

bioMérieux S.A., 2005/09. 08520 D -pt. Folheto Informativo - REF 43 560, Gelose Oxford

bioMérieux S.A., 2005/09. 12670 D -pt. Folheto Informativo - REF 30 706, Quality Control VIDAS (QCV).

bioMérieux S.A., 10/2005. Versão E. Manual de Utilização - REF 93 280, mini VIDAS

bioMérieux S.A., 2005/10. 11378 B -pt. Folheto Informativo - REF 43 041 / 43 049, Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

bioMérieux S.A., 2006/06. 12560 B -pt. Folheto Informativo - REF 42 072, Caldo FRASER

bioMérieux S.A., 09/2007. Versão A. Manual de Utilização - REF 4501-1643, VIDAS Heat and Go.

bioMérieux S.A., 2007/09. 1244 E -pt. Folheto Informativo - REF 43 621 / 43 629, Gelose chromID(tm) Salmonella (SM2).

bioMérieux S.A., 2008/02. 11600 J -pt. Folheto Informativo - REF 30 704, VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2).

bioMérieux S.A., 03/2008. Microbiological solutions for agri-food industries. Catalogue.

bioMérieux S.A., 2008/12. 08491 G -pt. Folheto Informativo - REF 42 048 / 42 112 / 42 615 / 42 627 / 42 727, Caldo FRASER - ½ Concentração

bioMérieux S.A., 2009/03. 07887 O -pt. Folheto Informativo - REF 10 300, api *Listeria*.

bioMérieux S.A., 2009/04. 12695 G -pt. Folheto Informativo - REF 43 641 / 43 649, Gelose chromID Ottaviani Agosti

bioMérieux S.A., 2009/06. 11600 J -pt. Folheto Informativo - REF 30 702, VIDAS *Salmonella* (SLM).

bioMérieux S.A., 09324 E - pt - 2006/11. Folheto Informativo - REF 43 563 / 43 564, Gelose XLD (XLD).

Clavijo R. I., Loui C., Andersen G. L., Riley L. W., Lu S.: **Identification of Genes Associates with Survival of *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen.** *Applied and Environmental Microbiology* 2006, **72**: 1055-1064.

Direcção Geral da Saúde (2010). Doenças de Declaração Obrigatória 2004-2008. DGS, Lisboa.

Doyle M.P., Beuchat L.R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 3rd Ed. 2007. ASM Press, Washington, D.C.

Dupont C., Agostin J.: **Influence of Stress on Single-Cell Lag Time and Growth Probability for *Listeria monocytogenes* in Half Fraser Broth.** *Applied and Environmental Microbiology* 2009, **75**: 3069-3076.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración.** Volumen 1. Segunda edición. 2000. Editorial ACRIBIA, S. A., Zaragoza, España.

Eurachem Guide (1998). The Fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation, Eurachem.

Eurachem Guide (2002). Accreditation for Microbiological Laboratories, Eurachem.

Eurachem Guide. The Selection and Use of Reference Materials. A Basic Guide for Laboratories and Accreditation Bodies, EEE/RM/062rev3, Eurachem.

Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D.: **Listeria monocytogenes – from saprophyte to intracellular pathogen.** *Nat Rev Microbiol.* 2009 September ; 7(9): 623. doi:10.1038/nrmicro2171.

Guenther S., Huwyler D., Richard S., Loessner M. J.: **Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of Listeria monocytogenes in Ready-To-Eat Foods.** *Applied and Environmental Microbiology* 2009, **75**: 93-100.

Guerra M. M., Bernardo F. A.: **O risco da listeriose e a identificação do perigo – Revisão.** *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2004, **99** (550) 69-76.

Guia RELACRE 6 (2007). Acreditação de Laboratórios de Ensaio Microbiológicos, Relacre, Lisboa.

Guilbaud M., Coppet P., Bourion F., Rachman C., Prévost H., Dousset X.: **Quantitative Detection of Listeria monocytogenes in Biofilms by Real-Time PCR.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2190-2194

Guillet C., Join-Lambert O., Monnier A., Leclercq A., Mechaï F., Mamzer-Bruneel M., Bielecka M., Scotti M., Disson O., Berche P., Vazquez-Boland J., Lortholary O., Lecuit M.: **Human Listeriosis Caused by Listeria ivanovii.** *Emerging Infectious Diseases*, 2010, Vol. 16, No. 1.

IPAC, (2005). Procedimento para Acreditação de Laboratórios, DRC005, IPAC.

IPAC, (2007). Regulamento Geral de Acreditação, DRC001, IPAC.

ISO 6579 (2002). International Standard – **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 6887-2 (2003). International Standard - **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.** 1st Edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 6887-4 (2003). International Standard - **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products.** 1st Edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 6887-4/Cor 1 (2004). International Standard - **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products.** TECHNICAL CORRIGENDUM 1. International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO/FDIS 6887-5 (2009). International Standard - **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.** 1st Edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 7218-1 (1996). International Standard – **Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.** 2<sup>nd</sup> Edition. International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 7218-1 AMENDMENT 1(2001). International Standard – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations – AMENDMENT 1. 2<sup>nd</sup> Edition. International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO/TS 11133-1 (2009). International Standard - **Microbiology and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.** 2nd Edition, International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO/TS 11133-2 (2003). **International Standard - Microbiology and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.** 1st Edition, Corrected version (2004-08-01). International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 11290-1 (1996). International Standard – **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method.** International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 11290-1 (1996). International Standard – **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* – Amendement Part 1: Detection method.** International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 16140 (2003). International Standard – **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.** International Organization for Standardization, Switzerland.

Jay J. M. (2006). **Modern food microbiology**, 6<sup>th</sup> ed., Aspen Publishers, Inc.

Jensen A. N., Dlsgaard A., Stokmarr A., Nielsen E. M., Baggesen D. L.: **Survival and Transmission of *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium in an Outdoor Organic Pig Farming Environment.** *Applied and Environmental Microbiology* 2006, **72**: 1833-1842.

Jeyaletchumi P., Tunung R., Margaret S., Son R., Farinazleen M. G., Cheah Y. K.: **Review Article. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods.** *International Food Research Journal* 2010, **17**: 1-11.

Lee S., Jung B. Y., Rayamahji N., Lee H. S., Jeon W. J., Choi K. S., Kweon C. H., Yoo H. S.: **A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification *Salmonella* spp., *Salmonella enteric* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats.** *J. Vet. Sci.* (2009), **10**(1), 43-51

Lightfoot N. F., Maier E. A. **Análise Microbiológica de Alimentos e Água. Guia para a Garantia da Qualidade**, 2003. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Löfström C., Krause M., Josefsen M., Hansen F., Hoorfar J.: **Validation of a same-day real-time PCR method for screening of meat and carcass swabs for *Salmonella*.** *BMC Microbiology* 2009, **9**:85.

Karsi A., Howe K., Kirkpatrick T., Wills R., Bailey R., Lawrence M.: **Development of bioluminescent *Salmonella* strains for use in food safety.** *BMC Microbiology*, 2008, **8**: 10.

Lyautey E., Lapen D. R., Wilkes B., McCleary K., Pagotto F., Tyler K., Hartmann A., Piveteau P., Rieu A., Robertson W. J., Medeiros D. T., Edge T. A., Gannon V., Topp E.: **Distribution and Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolates from Surface Waters of the South Nation River Watershed, Ontario, Canada.** *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**:5401-5410.

Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A., Helmuth R.: **Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**: 7046-7052.

Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P. A.: **Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products.** *Food Microbiology* 2004, **21**: 213-216.

Montville T. J., Matthews K. R. **Food Microbiology. An Introduction**, 2ª Edição, 2008. ASM Press, Washington, DC.

NP EN ISO/IEC 17025 (2005). Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaio e calibração, Instituto Português da Qualidade, Lisboa.

NP 2079 (1989). Norma Portuguesa – Microbiologia alimentar: Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade, Portugal.

Ohtsuka K., Yanagawa K., Takatori K., Hara-Kudo Y.: **Detection of *Salmonella enterica* in Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Characterization of *Salmonella* Isolates.** *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**: 6730-6735.

Pauly T. M., Tham W. A.: **Survival of *Listeria monocytogenes* in Wilted and Additive-Treated Grass Silage.** *Acta vet. scand.* 2003, **44**: 73-86.

Rall V. L. M., Rall R., Aragon L. C., Silva M. G.: **Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 2005, **36**: 147-150.

Regulamento (CE) N.º 365/2010 da Comissão de 28 de Abril de 2010 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar. *Jornal Oficial da União Europeia*. L 107/9, 2010.

Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L 322/12, 2007.

Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L 338/1, 2005.

Shinohara N. K. S., Barros V. B., Jimenez S. M. C., Machado E. C. L., Dutra R. A. F., Filho J. L. L.: ***Salmonella* spp., importante agente patigênico veiculado em alimentos.** *Ciência & Saúde Colectiva*, 2008. 13(5): 1675-1683.

Soyer Y., Switt A. M., Davis M. A., Maurer J., McDonough P. L., Schoonmaker-Bopp D. J., Dumas N. B., Root T., Warnick L. D., Gröhn Y. T., Wiedmann M.: ***Salmonella enteric***

**Serotype 4,5,12:i:-, an Emerging *Salmonella* Serotype That Represents Multiple Distinct Clones.** *Applied and Environmental Microbiology* 2009, **47**: 3546-3556.

Vlaemynck G., Lafarge V., Scotter S.: **Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium.** *Applied Microbiology*, 2000, **88**: 430-441.

WHO / FAO, 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series.

WHO, 2002. Food safety and foodborne illness. World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.

[www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt), consultado a 01-09-2010.

[www.ctic.pt](http://www.ctic.pt), consultado a 10-08-2010.

[www.who.int/en](http://www.who.int/en), consultado a 25-08-2010.

---

---

**Apêndice I**  
**Galeria API *Listeria***

---

---

## GALERIA API *Listeria*

O sistema API *Listeria* permite a identificação das bactérias do género *Listeria* através de 10 mini-testes bioquímicos e de uma base de dados. Cada galeria API *Listeria* (Figura 20) é composta por 10 microtubos que contêm os substratos desidratados que vão permitir a realização de testes enzimáticos ou de fermentações de açúcares (Tabela 47). As reacções que ocorrem nos microtubos, durante o período de incubação, traduzem-se por mudanças de cor espontâneas ou reveladas apenas com a adição de determinados reagentes. A identificação da bactéria é conseguida através da leitura das reacções ocorridas nos microtubos e através de um sistema de identificação ou consultando apenas a lista dos perfis do folheto informativo.

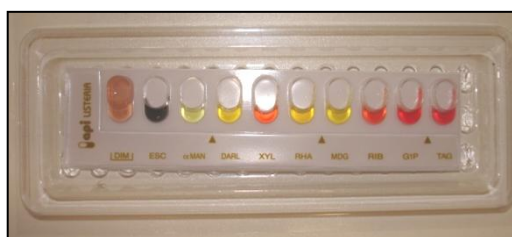


Figura 20 – Exemplo de uma galeria API *Listeria*.

Tabela 47 – Composição da galeria API *Listeria* e leitura dos resultados.

Galeria API <i>Listeria</i>					
Testes	Componentes activos	Quantidade (mg/cúpula)	Reacções	Resultados	
				Negativo	Positivo
<b>DIM</b>	Substrato enzimático	0,106	Diferenciação <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min Laranja pálido Beige rosado Beige acinzentado	
<b>ESC</b>	Esculina Citrate de ferro	0,16 0,024	Hidrólise (ESculina)	Amarelo pálido	Negro
<b>alphaMan</b>	4-nitrofenil- $\alpha$ D-manopiranosido	0,045	A-MANosidase	Incolor	Amarelo
<b>DARL</b>	D-Arabitól	0,4	Acidificação (D-ARabitoL)	Vermelho / vermelho alaranjado	Amarelo / amarelo alaranjado
<b>XYL</b>	D-Xylose	0,4	Acidificação (XYLose)		
<b>RHA</b>	L-Rhamnose	0,4	Acidificação (RHAmnose)		
<b>MDG</b>	Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido	0,4	Acidificação (Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido)		
<b>RIB</b>	D-Ribose	0,4	Acidificação (RIBose)		
<b>GIP</b>	Glucose-1-Fosfato	0,4	Acidificação (Glucose-1-Fosfato)		
<b>TAG</b>	D-Tagatose	0,4	Acidificação (TAGatose)		

Adaptado de *bioMérieux* (2009).

---

---

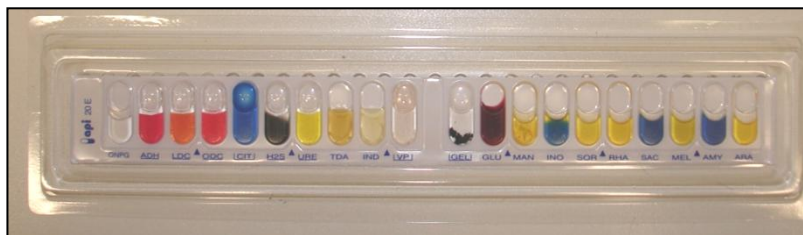
**Apêndice II**  
**Galeria API 20 E**

---

---

## Galeria API 20 E

O sistema API 20 E (Figura 21) permite a identificação das bactérias da família *Enterobacteriaceae* através de 21 mini testes bioquímicos (Tabela 48) e de uma base de dados. Cada galeria API 20 E é composta por 20 microtubos, que contêm os substratos desidratados e que são inoculados com uma suspensão bacteriana. Durante o período de incubação ocorrem reacções que se traduzem pela viragem espontânea da cor ou reveladas, apenas, através da adição de reagentes. O teste da oxidase é efectuado à parte, de acordo com as indicações do fabricante, e constitui o 21º teste. A identificação das bactérias é conseguida através da leitura das reacções ocorridas nos microtubos e através de um programa de identificação (*apiweb*<sup>TM</sup>).



**Figura 21** – Exemplo de uma galeria API 20 E.

**Tabela 48** – Composição da galeria API 20 E e leitura dos resultados.

Galeria API 20 E					
Testes	Componentes activos	Quantidade (mg/cúpula)	Reacções	Resultados	
				Negativo	Positivo
ONPG	2-nitrofenil-βD-galactopiranosida	0,223	β-galactosidase (Orto Nitrofenil- βD-Galactopiranosida)	Incolor	Amarelo
ADH	L-arginina	1,9	Arginina DiHidrolase	Amarelo	Vermelho / alaranjado
LDC	L-lisina		Lisina DesCarboxilase		
ODC	L-ornitina		Ornitina DesCarboxilase		
CIT	Citrato de sódio	0,756	utilização do CITrato	Verde pálido / Amarelo	Azul esverdeado / azul
H <sub>2</sub> S	Tiosulfato de sódio	0,075	Produção de H <sub>2</sub> S	Incolor / acinzentado	Depósito negro / orla fina
URE	Ureia	0,76	UREase	Amarelo	Vermelho / alaranjado
TDA	L-triptofano	0,38	Triptofano DesAminase	TDA / imediato Amarelo	Castanho avermelhado
IND	L-triptofano	0,19	produção de INDol	JAMES / imediato Incolor, verde pálido, amarelo	Rosa
VP	Piruvato de sódio	1,9	Produção de acetoína (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min Incolor / rosa pálido	vermelho
GEL	Gelatina (origem bovina)	0,6	Gelatinase (GELatina)	Não difusão	Difusão do pigmento negro
GLU	D-glucose	1,9	Fermentação / oxidação (GLUcose)	Azul / azul esverdeado	Amarelo / amarelo acinzentado
MAN	D-manitol		Fermentação / oxidação (MANitol)		Amarelo
INO	Inositol		Fermentação / oxidação (INOsitol)		
SOR	D-sorbitol		Fermentação / oxidação (SORbitol)		
RHA	L-ramnose		Fermentação / oxidação (RAMnose)		
SAC	D-sacarose		Fermentação / oxidação (SACarose)		
MEL	D-melibiose		Fermentação / oxidação (MELibiose)		
AMY	Amigdalina		Fermentação / oxidação (AMIdalina)		
ARA	L-arabinose	Fermentação / oxidação (ARAbinose)			
OX			Citocromo-Oxidase		

Adaptado de *bioMérieux* (2009).