

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS VIDAS® SLM E VIDAS® SPT PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM PRODUTOS CÁRNEOS PROVENIENTES DE DIFERENTES CIDADES DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Jaqueline Wolschick¹, Rosângela Uhrig Salvatori², Tainá Drebes³

Resumo: A *Salmonella* é o micro-organismo que mais causa doenças de origem alimentar no mundo. Para detecção de *Salmonella* em alimentos existem métodos, entre eles, os métodos rápidos (alternativos). O objetivo deste estudo foi comparar o método VIDAS® SLM e o método VIDAS® SPT, utilizando-se cem amostras de produtos cárneos produzidas no interior do Rio Grande do Sul, Brasil. Além disso, foram contaminadas artificialmente oito amostras usando as diluições 10⁻⁶ a 10⁻⁹ da fase estacionária da cepa de *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Para a realização das análises foram utilizados métodos validados pela AOAC. Foi encontrada diferença significativa entre os dois métodos (P<0,05). Conclui-se que o método VIDAS® SLM pode ser uma boa ferramenta para as indústrias produtoras de produtos cárneos. Sugere-se que mais estudos sejam realizados com o Kit VIDAS® UP *Salmonella*.

Palavras-chave: Produtos cárneos. *Salmonella*. VIDAS®.

1 INTRODUÇÃO

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) revelam que o Brasil é hoje, o maior exportador mundial de carne bovina e de aves e o 4º maior exportador mundial de carne suína. Países exportadores de produtos do agronegócio têm enfrentado grande competitividade, e alguns fatores têm influenciado este fato, como: a intensificação das relações comerciais internacionais, o aumento da renda e o crescimento da população mundial. Diante desses fatos, o Departamento das Indústrias Intensivas em Mão de Obra e Recursos Naturais afirma que o Brasil se consolida como o principal produtor e exportador de proteína de origem animal (MDIC, 2011).

A produção de alimentos deve ser feita de maneira que possa ser garantida a segurança e a estabilidade do produto durante a vida de prateleira. Em função disso, as indústrias alimentícias têm tomado medidas para que possa ser atendida a legislação vigente e também, as exigências de consumidores. A *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) estabeleceu – em 1974 – critérios microbiológicos, com o objetivo de proteger a saúde pública, disponibilizando assim alimentos seguros, saudáveis e que satisfaçam os requerimentos do comércio (FORSYTHE, 2002).

1 Bacharela em Biomedicina com Habilitação em Microbiologia de Alimentos pela Univates. O artigo é baseado no Trabalho de Conclusão defendido no semestre 2012/B.

2 Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora da Univates. Orientadora do Trabalho.

3 Mestranda em Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Gerente Técnica do Laboratório de Microbiologia do Unianálises/Univates. Co-orientadora do Trabalho.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) cita a segurança alimentar como um fator importante para a saúde pública e afirma que aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morrem devido doenças diarreicas por ano no mundo, e que, na maioria dos casos, estão ligados a alimentos ou água contaminados (OMS, 2006). Dentre as doenças de origem alimentar, a salmonelose é a mais comum e amplamente distribuída. Estabelecendo assim, um problema de saúde pública e tornando-a de importância financeira para muitos países (OMS, 2005).

A *Salmonella enteritidis*, de fagotipo (PT4) é considerada a principal causa de salmonelose no mundo. O aumento mundial do consumo de carne e seus derivados resulta na disseminação de novos sorotipos deste micro-organismo, sorotipos esses, que surgem através da mudança na criação dos animais. Essas mudanças acarretam em sorotipos multirresistentes a antibióticos (FORSYTHE, 2002). A *Salmonella* é um micro-organismo que faz parte da família *Enterobacteriaceae*, encontra-se na forma de bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado. É capaz de fermentar a glicose, porém não metaboliza lactose e sacarose, produz ácido e gás. Com exceção da *Salmonella gallinarum* e da *Salmonella pullorum*, que são imóveis, as outras espécies são móveis e possuem flagelos peritríquios (JAY, 2005).

A capacidade de sobrevivência por longos períodos no ambiente e a ampla distribuição da *Salmonella* nos animais são fatores que facilitam os surtos de salmoneloses em todo o mundo. Surtos que, preocupam as autoridades sanitárias e que inviabilizam ou dificultam internacionalmente o comércio de alimentos (BUTAYE et al., 2003). A salmonelose ainda está associada a outros tipos de alimentos, tais como: ovos, leite e derivados, peixes, camarões, molhos e temperos para salada, mistura para bolo, sobremesas recheadas e cobertas por creme, cacau e chocolates (FORSYTHE, 2002).

Essa doença de origem alimentar é causada pelo consumo de alimentos que contenham concentrações em torno de 10^7 a 10^9 células/g – nível de contaminação necessária para que ocorra a salmonelose. Os sintomas característicos de uma salmonelose são: náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia, que surgem após um período de incubação de aproximadamente 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos. A enfermidade normalmente persiste durante dois a sete dias (JAY, 2005).

Para conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado e os riscos que este alimento pode oferecer à saúde de consumidor, bem como, a vida útil que este alimento terá, são necessárias análises laboratoriais. No caso de uma contaminação do alimento, será possível, através da análise, determinar qual é o agente etiológico causador de infecção alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Para realização das análises é necessária a utilização de métodos, os quais devem ser confiáveis, robustos e validados. Os métodos de detecção podem ser divididos em convencionais ou rápidos (alternativos) (FORSYTHE, 2002). Os métodos convencionais são utilizados como métodos oficiais por diversos laboratórios e foram desenvolvidos há muitos anos. Quando se trata de métodos de detecção de micro-organismos patogênicos, os métodos convencionais são constituídos de diversas etapas que dependem muito tempo, custo e mão de obra de trabalho (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Devido ao tempo elevado de análise por métodos convencionais, surgiram na década de 70 os métodos rápidos (alternativos). A demanda por métodos rápidos faz com que esse mercado cresça e torne-os cada vez mais específicos e sensíveis. O Sistema VIDAS® é um teste imunoenzimático, e tem se destacado pela simplicidade, especificidade, sensibilidade e conveniência como método de triagem (FRANCO, 2006).

Este trabalho teve como objetivo avaliar um método novo e mais rápido disponível no mercado, Kit VIDAS® UP *Salmonella* (VIDAS® SPT) em relação ao atualmente utilizado, Kit VIDAS® *Salmonella* (VIDAS® SLM), o qual é reconhecido pela *Association of Official Agricultural Chemists*

(AOAC) e pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), mas que necessita de pelo menos 48 - 52 horas para detecção do resultado negativo. Já o VIDAS® SPT, também certificado pela AOAC, libera resultado negativo de *Salmonella* em 18 horas, beneficiando assim as empresas alimentícias no monitoramento de processos de produção e/ou produtos terminados. Além disso, a diminuição de estocagem e a otimização de processos. Além da comparação dos dois métodos, oito amostras foram contaminadas artificialmente para determinar o limite de detecção (LD) de cada método.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o mês de outubro de 2012 foram analisadas aleatoriamente 100 amostras de produtos cárneos produzidos no interior do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras analisadas no Laboratório de Microbiologia do Unianálises foram carne de frango, gado, suína ou produtos mistos, estando entre elas, CMS (carne mecanicamente separada) de frango, costela suína, charque bovino, presunto cozido, salsicha, mortadela, linguiça, fiambre, queijo de porco, torresmo, entre outros.

2.1 Teste VIDAS® SLM

Para realização do teste VIDAS® SLM foi utilizado método validado pela AOAC (996.08). Foram pesadas 25 g de cada amostra, adicionadas à 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Oxoid, Reino Unido), como etapa de pré-enriquecimento. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C} / 18\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Após o período de incubação, realizou-se o enriquecimento com meio líquido seletivo, transferindo uma alíquotas de 0,1mL para caldo *Salmonella* Xpress 2 (SX2) (Biomérieux, França), incubados $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C} / 24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Posteriormente, foram transferidos 500 µL do caldo SX2 para a barrete de testes do VIDAS®, aquecida por $15 \pm 1\text{ min}$ no equipamento Heat and Go®. Após resfriamento da barrete por cerca de 10 min, realizou-se o ensaio imunoenzimático pelo equipamento. Os resultados foram obtidos aproximadamente em 45 minutos.

Em caso de resultado positivo, as amostras foram confirmadas através de provas bioquímicas seguindo protocolo da ISO 6579:2002 (E). Primeiramente, realizou-se isolamento em Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) (Oxoid Reino Unido) e Ágar Rambach (Merck, Alemanha). Colônias características presentes nos ágares XLD e Rambach, foram estriadas em ágar nutriente (BD, França) para purificação e isolamento. A partir da cultura isolada foram realizados testes bioquímicos utilizando Triple Sugar Iron Agar (TSI) (BD, França), L-Lysine Broth (Oxoid, Reino Unido), Urea Agar (Oxoid, Inglaterra), Voges-Proskauer (Oxoid, Inglaterra), Triptofano (Himedia, Índia), ONPG (BD, Irlanda) e prova de sorologia (anti-soro O, H e Vi) (Probac do Brasil, Brasil).

2.2 Teste VIDAS® SPT

Para a realização do teste VIDAS® SPT, foi utilizado o método validado pela AOAC RI (071101). Foram pesadas 25 g de cada amostra, adicionado a 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Oxoid, Reino Unido) acrescentado de 1mL de suplemento *Salmonella* (SUPP) (Biomérieux, França), homogeneizado e incubado a $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C} / 18 - 24\text{ h}$. Após o período de incubação, foi transferido 500 µL do caldo de pré-incubação para a barrete de testes do VIDAS®, aquecido por $5 \pm 1\text{ min}$ no equipamento Heat and Go®. Após o resfriamento da barrete por cerca de 10 min, realizou-se o ensaio imunoenzimático pelo equipamento. Os resultados foram obtidos em aproximadamente 45 minutos.

Em caso de resultado positivo, as amostras foram confirmadas através de provas bioquímicas seguindo protocolo da ISO 6579:2002 (E). Primeiramente foi realizado isolamento em Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) (Oxoid, Reino Unido) e Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose

Agar (BPLS) (Oxoid, Inglaterra). Colônias características presentes nos ágaros XLD e BPLS foram estriadas em ágar nutriente (BD, França) para purificação e isolamento. A partir da cultura isolada foram realizados testes bioquímicos utilizando Triple Sugar Iron Agar (TSI) (BD, França), L-Lysine Broth (Oxoid, Reino Unido), Urea Agar (Oxoid, Inglaterra), Voges-Proskauer (Oxoid, Inglaterra), Triptofano (Himedia, Índia), ONPG (BD, França) e prova de sorologia (anti-soro O, H e Vi) (Probac do Brasil, Brasil).

2.3 Limite de Detecção do Método (LD)

Além das 100 amostras naturalmente contaminadas utilizadas no presente estudo, foram contaminadas artificialmente oito amostras. Uma matriz de carne de frango previamente autoclavada foi utilizada para o teste, sendo esta contaminada utilizando-se cepa de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, a partir da fase estacionária (FE) – cultivada em Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid, Reino Unido). Diluições sucessivas foram realizadas a partir da FE (10^9) até a diluição 10^{-9} , sendo inoculado 1 mL das diluições 10^{-6} a 10^{-9} , em uma alíquota de 25 g da matriz. A realização das análises procedeu conforme os protocolos citados anteriormente. Foi utilizada ainda, uma amostra sem contaminação como controle negativo. Após os períodos de incubação, as amostras foram colocadas no equipamento, e após da liberação do resultado, avaliou-se o limite de detecção de cada método. Paralelamente à contaminação das amostras foi inoculado 1 mL de cada diluição (10^{-6} a 10^{-9}) em Petrifilm™ AC para realização da contagem padrão de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em cada diluição.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 100 amostras analisadas pelo método VIDAS® SLM, quatro amostras tiveram resultado presuntivo positivo no equipamento miniVIDAS®. As quatro amostras são de origem suína, sendo uma delas uma costela com osso, e as outras três amostras, linguças. Já pelo método VIDAS® SPT, três amostras tiveram resultado presuntivo positivo no equipamento miniVIDAS®. Duas amostras de origem suína – uma costela com osso e uma linguça e ainda, uma amostra de origem bovina – carne de cabeça.

Na comparação dos dois métodos, apenas duas amostras apresentaram o mesmo comportamento. Duas amostras que tiveram resultado presuntivo positivo no método VIDAS® SLM, apresentaram resultado negativo no método VIDAS® SPT. E também, uma amostra teve resultado presuntivo positivo no método VIDAS® SPT, apresentando resultado negativo no método VIDAS® SLM.

Todas as amostras presuntivas positivas foram isoladas e submetidas a testes bioquímicos, obtendo-se, com exceção de uma amostra, resultado positivo para as amostras positivas presuntivas detectadas por ambos os métodos. Uma amostra de linguça suína que apresentou resultado presuntivo positivo nos dois métodos, não confirmou quando submetida a testes bioquímicos, revelando resultado falso-positivo.

Os resultados do plaqueamento das diluições da FE foram os seguintes: diluição 10^{-6} = 1.160 UFC/mL, diluição 10^{-7} = 161 UFC/mL, diluição 10^{-8} = 19 UFC/mL e diluição 10^{-9} = 2 UFC/mL. Das quatro amostras contaminadas artificialmente testadas no método VIDAS® SLM, 3 delas apresentaram resultado positivo – diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Já a amostra da diluição 10^{-9} e o controle negativo, tiveram resultado negativo. O resultado não foi o mesmo para o método VIDAS® SPT, onde apenas a amostra da diluição 10^{-6} positivou no equipamento, logo, as amostras das outras diluições e o controle negativo apresentaram resultado negativo.

Analisando os dados acima, é possível dizer que o método VIDAS® SPT é capaz de detectar contaminações com cerca de 1.100 UFC. Em contrapartida, o método VIDAS® SLM mostra-se mais sensível tendo um limite de detecção de aproximadamente 20 UFC.

O método VIDAS® SPT foi validado pela ISO 6579 em dois laboratórios, onde foram analisadas 505 amostras entre elas produtos cárneos, produtos lácteos e amostras ambientais. A partir deste estudo foi concluído que os dois métodos (VIDAS® SPT e ISO) têm 99% de concordância, e conseqüentemente tal resultado garante ao método alta sensibilidade e especificidade (BIOMÉRIEUX, 2011).

O presente estudo teve resultado parcialmente semelhante ao estudo realizado para validação do VIDAS® SPT. Analisando estatisticamente os resultados pelo Programa Probilitas, a especificidade e a sensibilidade do método VIDAS® SPT, quando comparado ao VIDAS® SLM, os resultados obtidos foram, respectivamente, 97,9% e 66,7%. Tal resultado foi observado devido ao VIDAS® SPT ter falhado na detecção de duas amostras positivas. Ainda considerando a análise estatística dos resultados do estudo, detectou-se, a partir do teste Qui-Quadrado, diferença significativa entre os dois métodos ($P < 0,05$).

Oktaç e Heperkan (2006) realizaram um estudo com produtos lácteos e batatas cozidas e não encontraram diferença significativa quando compararam o método ISO e o método VIDAS® SLM, sendo ainda, que o método VIDAS® foi capaz de detectar baixos níveis de contaminação. Uyttendaele et al. (2003) encontraram resultado semelhante quando analisaram produtos cárneos natural e artificialmente contaminados novamente comparando o método ISO e o método VIDAS® SLM. Os autores concluíram que existia 95% de concordância entre os dois métodos, e que o Sistema VIDAS® apresentou 93% de sensibilidade. Outro estudo similar realizado por Walker et al. (2001), comparando os mesmos métodos em leite, apresentou taxa de concordância entre os métodos de 91,33%, os autores também não encontraram diferença significativa entre os dois métodos.

Em contrapartida, Eriksson e Aspan (2007) encontraram resultados diferentes. Eles utilizaram amostras de fezes de gado, porco e frango para comparar métodos de cultura, ELISA e PCR – o método ELISA apresenta similaridade com o método VIDAS® – e concluíram que os imunoenaios foram, em geral, menos sensíveis do que métodos de cultura. Os autores declararam que alguns sorotipos não foram facilmente detectados por alguns dos métodos de ELISA utilizados, e acreditam que o fato pode estar na fraca ligação com os anticorpos.

Pinto et al. (2007) compararam os métodos ISO, VIDAS® e FISH em amostras suínas e encontraram diferença significativa entre o método ISO e VIDAS®, onde o VIDAS® falhou na detecção de 16 amostras positivas no método ISO.

Avaliando os resultados do presente estudo acredita-se que alguns fatores tenham levado a diferença significativa dos métodos. Sendo um deles o pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, que no método VIDAS® SLM é feito em duas etapas, o pré-enriquecimento feito com água peptonada tamponada 1% para recuperação das células mais estressadas e injuriadas, e o enriquecimento seletivo com *Salmonella* Xpress Broth. Já no método VIDAS® SPT as duas etapas ocorrem simultaneamente. Supõe-se que o Suplemento adicionado à água peptonada tamponada 1% possa inibir a recuperação das células injuriadas pelo processo de produção do alimento.

Outro fator que pode ter contribuído para a diferença dos métodos é o uso de diferentes matrizes cárneas, deste modo, o método VIDAS® SPT pode ter tido dificuldades de detectar *Salmonella*.

4 CONCLUSÃO

O Sistema VIDAS® SLM Biomérieux® mostrou-se mais eficiente do que o Sistema VIDAS® SPT Biomérieux®, e acredita-se que este pode ser uma importante ferramenta para as empresas produtoras de produtos cárneos, tais como, carne de gado, frango e suíno.

Sugere-se que mais estudos sejam feitos com o Sistema VIDAS® SPT, usando outras matrizes amostrais, maior número de amostras e que seja comparado com o método ISO 6579. Sendo que assim, podem-se obter resultados úteis para utilização deste sistema no Controle de Qualidade de produtos alimentícios para garantia da saúde pública, diminuindo o número de resultados falso-negativos, agilizando o trabalho no laboratório, diminuindo mão de obra e custos.

REFERÊNCIAS

- BIOMÉRIEUX. **VIDAS UP Salmonella (SPT)**. BioMérieux is introducing a new technology for detection of salmonella in food and environmental samples in line with the increasing demands for food safety, 2011. Disponível em: <http://www.groco.is/groco/upload/files/frettir_2011/nyr_protocol_fyrir_vidas.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2012.
- BUTAYE, Patrick. et al. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 16, n. 2, p. 175-188, 2003. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/16/2/175.full.pdf+HTML>>. Acesso em: 14 ago. 2012.
- ERIKSSON, Erik; ASPAN, Anna. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. **BMC Veterinary Research**, v.21, n.3, p.1-19, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/21>>. Acesso em: 26 out. 2012.
- FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FRANCO, Bernadete D. G. M. **Métodos rápidos em microbiologia de alimentos**. USP, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/M_todos_r_pidos_apostila%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 07 set. 2012.
- FRANCO, Bernadete D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 6579:2002 (E)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO, 2002. p. 1-27.
- JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – MDIC. **A Cadeia Produtiva de Carnes**. Departamento das Indústrias Intensivas em Mão-de-Obra e Recursos Naturais, 2011. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=855>>. Acesso em: 14 ago. 2012.
- OKTAY, Hatice I.; HEPERKAN, Dilek. Evaluation of ISO method and VIDAS automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 133 - 145, 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/AGR/IND43812599>>. Acesso em: 31 out. 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Cinco chaves para uma alimentação mais segura**. Portugal, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Salmonella Resistente**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 14 ago. 2012.

PINTO, M. V et al. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.59, n.6, 1388-1393, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000600006>. Acesso em: 21 mar. 2012.

UYTTENDAELE, M. et al. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 386 - 391, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633109>>. Acesso em: 31 out. 2012.

WALKER, R. L. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, P.123-129, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482560>>. Acesso em: 16 nov. 2012.