



Comparação de três métodos para deteção de *Salmonella* em diversos géneros alimentícios

Comparison of three methods for Salmonella detection in different categories of foodstuffs

Rosália Furtado¹, Anabela Coelho¹, Marisa Morais², Ana Lúcia Leitão^{2,3}, Margarida Saraiva¹, Cristina Belo Correia¹, Rita Batista¹

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa e Porto, Portugal

(2) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

(3) Centro de Engenharia Mecânica e Sustentabilidade de Recursos. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

_Resumo

Em 2020, de acordo com os dados, reportados por 22 Estados-membros e 5 Estados não-membros, constantes do *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, elaborado em conjunto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* foi o principal agente etiológico responsável por surtos de origem alimentar, estando envolvida em 694 surtos, que resultaram em 3686 casos de doença, 812 hospitalizações e 7 mortes. Considerando a importância desta bactéria zoonótica na segurança alimentar e na saúde humana, várias estratégias para a sua deteção e controlo em géneros alimentícios têm sido desenvolvidas e implementadas. Neste trabalho de estudo, foram analisadas 137 amostras de géneros alimentícios (78 naturais, potencialmente contaminadas, 21 artificialmente contaminadas com níveis altos de *Salmonella* e 38 artificialmente contaminadas com níveis baixos de *Salmonella*), com o objetivo de comparar o desempenho de três métodos de deteção de *Salmonella* spp.: o método cultural de referência da *International Organization for Standardization* (ISO), ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020; um método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real e um método imunoenzimático automatizado. Embora o método de PCR em tempo real tenha sido o mais rápido, foi também o que evidenciou um maior número de falsos positivos e de resultados inconclusivos, estes últimos devido à inibição da reação de PCR. Executando o ensaio de acordo com os protocolos dos métodos ISO e imunoenzimático automatizado, obtiveram-se resultados equivalentes, tendo estes evidenciado ser mais robustos do que o PCR em tempo real ao testar diferentes matrizes alimentares, apesar do seu tempo de resposta ser mais demorado. A escolha de um método de PCR em tempo real pode ser apropriada quando o objetivo é testar matrizes alimentares que se sabe não interferirem com a reação de PCR e nas quais se espera um resultado negativo para *Salmonella*, não necessitando assim de uma confirmação posterior. Todos os métodos analíticos testados neste estudo, evidenciaram vantagens e limitações e, assim, podem ser utilizados como método de eleição para a deteção de *Salmonella* em géneros alimentícios, de acordo com o objetivo da análise laboratorial.

_Abstract

In 2020, according to data reported by 22 Member States and 5 non-Member States, included in *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, prepared jointly by the *European Food Safety Authority* (EFSA) and

the *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* was the main agent responsible for foodborne outbreaks, being involved in 694 outbreaks, which resulted in 3686 cases of illness, 812 hospitalizations and 7 deaths. Considering the importance of this zoonotic bacterium in food safety and human health, several strategies for its detection and control in foodstuffs have been developed and implemented. In this study, 137 food samples (78 potentially naturally contaminated, 21 artificially contaminated with high levels of *Salmonella* and 38 artificially contaminated with low levels of *Salmonella*) were analyzed in order to compare the performance of three *Salmonella* spp detection methods: The *International Organization for Standardization* (ISO) Cultural Reference Method, ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020; a real-time *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method and an automated enzyme-linked immunosorbent method. Although the real-time PCR method was the fastest, it was also the one that showed the highest number of false positives and inconclusive results, the latter due to the inhibition of the PCR reaction. ISO and automated enzyme-linked immunosorbent methods gave equivalent results and proved to be more robust than real-time PCR when testing different food matrices, despite their longer response times. Real-time PCR method may be appropriate when the objective is to test food matrices that are known not to interfere with the PCR reaction and in which a negative result for *Salmonella* is expected, thus not requiring further confirmation. All the analytical methods tested in this study showed advantages and limitations and, therefore, can be used as the method of choice for the detection of *Salmonella* in foodstuffs, according to the purpose of the laboratory analysis.

_Introdução

A presença, nos géneros alimentícios, de bactérias patogénicas capazes de causar doenças transmitidas por alimentos continua a ser um importante problema de saúde pública para os consumidores em todo o mundo, com consequências económicas para os produtores e a indústria, desafiando uma abordagem multissetorial *One Health* para a implementação oportuna de medidas preventivas (1).



Em 2020, de acordo com os dados constantes do *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, elaborado em conjunto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* foi o agente etiológico mais frequentemente identificado em surtos de toxinfecção de origem alimentar, sendo responsável por 22,5% (N=694) de um total de 3086 surtos reportados. Nestes surtos, este agente foi responsável pelo maior número de hospitalizações (n=812, 48,5% do número total) e por 7 mortes (22,6% do número total). *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium monophasic* foram os serovares predominantes em 92,8% dos surtos causados por *Salmonella*. A ocorrência destes surtos foi frequentemente associada ao consumo de alimentos do grupo “ovos e ovoprodutos”, seguido do grupo “carne e produtos à base de carne” e de “alimentos compostos por múltiplos ingredientes” (2).

O método padrão (*golden standard*) para a deteção de *Salmonella* em géneros alimentícios inclui o uso de técnicas convencionais culturais que utilizam etapas de enriquecimento com seletividade crescente, terminando com o isolamento de *Salmonella* em placas de agar diferencial seletivo. A confirmação é baseada em testes bioquímicos ou realizada por espectrometria de massa (3). Embora esta metodologia seja bastante sensível e menos dispendiosa, é mais trabalhosa, tornando-se menos conveniente quando o objetivo é a análise de um elevado número de amostras. Para além disso, o tempo que decorre até à obtenção do resultado final pode ser muito longo, especialmente para alimentos em natureza (3). Com a finalidade de superar estas desvantagens, têm vindo a ser realizados estudos que visam o desenvolvimento de metodologias de fácil utilização, e ao mesmo tempo rápidas, sensíveis e específicas que possibilitem um *screening*, eliminando a fase cultural das amostras negativas no teste. Têm sido, por exemplo, desenvolvidos vários métodos imunológicos que dependem da ligação antigénio-anticorpo, para a deteção de *Salmonella* (4-6). Os alvos destes ensaios são componentes celulares específicos, como lipossacarídeos ou outras biomoléculas da membrana externa bacteriana. Apesar de um tempo de

ensaio mais curto em comparação com as técnicas de cultura tradicional, a deteção baseada em reações antigénio-anticorpo pode apresentar alguns problemas, como por exemplo a baixa sensibilidade do anticorpo para o microrganismo patogénico e a potencial interferência com contaminantes (7). Os avanços na biotecnologia têm levado também ao desenvolvimento de diversos métodos baseados na deteção de ácidos nucleicos, entre os quais os que utilizam a reação da polimerase em cadeia (PCR) (8,9). Nas abordagens baseadas na PCR, a deteção depende da amplificação de uma sequência que caracteriza o alvo e que pode ser amplificada milhões de vezes em menos de uma hora. Os métodos baseados na PCR têm mostrado especificidade, sensibilidade e precisão e um tempo de análise mais curto, contudo vários constituintes das matrizes alimentares podem inibir a reação.

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo a comparação do desempenho do método convencional cultural de acordo com o método de referência ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020, com outras duas metodologias utilizadas para a deteção de *Salmonella* spp: um método baseado na técnica de PCR em tempo real e um sistema imunoenzimático automatizado para a deteção de antígenos de *Salmonella*.

_Materiais e métodos

Neste estudo foram selecionadas e analisadas 137 amostras de géneros alimentícios, divididas em sete categorias diferentes (carnes cruas, alimentos prontos para consumo, mariscos, especiarias, cacau e derivados, ovoprodutos e laticínios). As amostras foram compradas em diferentes supermercados locais ou recolhidas em unidades de alimentação coletiva. Após aquisição, as amostras foram transportadas e armazenadas a temperatura adequada à sua conservação, e analisadas no prazo máximo de 24 h após a colheita. Destas 137 amostras, consideraram-se 3 grupos: A – 78 testadas como potencialmente contaminadas; B – 21 artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* de 10^7 ufc (unidades formadoras de colónias) /25 g de amostra; e C – 38 artificialmente contamina-



das com níveis de *Salmonella* <120 ufc / 25 g de amostra. Como controlo positivo foram utilizadas três amostras da avaliação externa da qualidade e duas amostras obtidas de água peptonada tamponada (BPW), uma contaminada com *S. Goldcoast* (13 ufc/lentícula) e outra com *S. Typhimurium* (30-120 ufc/lentícula). Como controlo do processo (“branco”) foi utilizada BPW não inoculada.

As amostras foram ensaiadas para a deteção de *Salmonella* pelo método de referência internacional ISO 6579-1:2017/ Amd 1:2020 e por outras duas metodologias de *screening*: uma técnica de PCR em tempo real e um método imunoenzimático automatizado (10).

Resultados e discussão

Os resultados relativos à deteção de *Salmonella* spp, pelo método de referência ISO 6579-1/Amd 1:2020 e pelo método alternativo, imunoenzimático automatizado, foram coincidentes, para o total de amostras analisadas (tabela 1).

Quando comparados os resultados obtidos pelo método imunoenzimático automatizado e pelo método de referência ISO, para as amostras potencialmente naturalmente conta-

minadas (grupo A), verificamos que em ambos os métodos em 3 das 78 amostras testadas (3,8%) se obteve um resultado positivo, e para as restantes um resultado negativo.

Se compararmos os resultados obtidos pelo método de PCR com os obtidos pelo método de referência ISO, para as amostras potencialmente naturalmente contaminadas (grupo A), verificamos que em 3 das 78 amostras (3,8%) se obtiveram resultados falsos positivos (tabela 1). Este facto pode estar relacionado com a potencial existência de células de *Salmonella* não viáveis, ou viáveis mas não cultiváveis (VBNC) nas amostras, que apesar de não se terem desenvolvido durante a etapa de enriquecimento, puderam ser detetadas por PCR. É importante salientar que, ao contrário das células de *Salmonella* não viáveis, as células de *Salmonella* VBNC podem manter a sua patogenicidade, sendo de referir que a recuperação destas células patogénicas se tornou um importante ramo de investigação devido às implicações que podem ter em saúde pública (11).

Quando analisados os resultados obtidos com os métodos imunoenzimático automatizado e ISO, para as amostras artificialmente contaminadas (grupos B e C), verificamos que,

Tabela 1: Resultados de deteção de *Salmonella* spp. – comparação entre os três métodos utilizados.

Resultados da deteção de <i>Salmonella</i> spp.					
Grupo	N.º amostras		ISO (%)	Imunoenzimático automatizado (%)	PCR (%)
A	78	+	3/78 (3,8)	3/78 (3,8)	6/78 (7,7)
		-	75/78 (96,2)	75/78 (96,2)	59/78 (75,6)
		?	0/78 (0)	0/78 (0)	13/78 (16,7)
B	21	+	21/21 (100)	21/21 (100)	21/21 (100)
		-	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
		?	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
C	38	+	36/38 (94,7)	36/38 (94,7)	33/38 (86,8)
		-	2/38 (5,3)	2/38 (5,3)	2/38 (5,3)
		?	0/38 (0)	0/38 (0)	3/38 (7,9)

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; ? Resultados inconclusivos. A – Potencialmente naturalmente contaminadas; B – Artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* de 10⁷ ufc/25 g de amostra; C – Artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* <120 ufc/25 g de amostra



com exceção de duas amostras de canela, nas quais ocorreu inibição do crescimento microbiano (grupo C), todas as outras amostras artificialmente contaminadas testaram positivo para *Salmonella*, mesmo quando os níveis de contaminação foram inferiores a 5 ufc. Esta inibição do crescimento bacteriano por algumas especiarias, como a canela, é um fenómeno já conhecido e relatado por diversos autores (12,13).

Relativamente ao método de PCR, para além dos resultados falso positivos, verificamos que algumas das matrizes alimentares testadas (cravinho, orégãos, piri-piri, cacau magro, ovos, gema de ovo, camarão e canela) inibiram a PCR, conduzindo por isso a resultados inconclusivos (assinalados com um ? na tabela 1). Em algumas destas matrizes foi possível evitar esta inibição, através da diluição dos ácidos nucleicos extraídos (14). No entanto, neste estudo, não foi possível diminuir a inibição da reação de PCR para os ovos e os orégãos.

Tendo em conta que a gema e a clara de ovo diferem significativamente na sua composição, e que os ovos são o alimento mais comumente reportado como estando envolvido na transmissão de *Salmonella*, decidimos avaliar o efeito inibitório da clara e gema de ovo na amplificação por PCR, concluindo que no ovo a matriz gema, contém mais inibidores do que a matriz clara, resultados que estão de acordo com os descritos anteriormente por Xiaohua He e colaboradores (15).

Na última década, tanto a crescente preocupação por parte da indústria e consumidores com a segurança alimentar, como o impacto económico das doenças transmitidas por alimentos, têm impulsionado o desenvolvimento de novas metodologias para a deteção de agentes patogénicos em alimentos que sejam rápidas, sensíveis e fáceis de usar. No âmbito deste estudo, os métodos alternativos imunoenzimático automatizado e de PCR, foram testados em paralelo com o método padrão ISO 6579-1, como métodos alternativos de *screening* dos resultados negativos.

Comparando os tempos necessários para obter um resultado (positivo para *Salmonella* – Detetado; ou negativo para *Salmonella* – Não detetado) para os três métodos utilizados

neste estudo, podemos concluir que se a amostra a testar for negativa para *Salmonella*, o método de PCR em tempo real é o método mais rápido ($\approx 24h$), seguido pelo método imunoenzimático automatizado ($\approx 48h$) e pelo método ISO ($\approx 72h$). No entanto, sendo o método padrão para a deteção de *Salmonella* o preconizado pela ISO, sempre que se obtém um resultado positivo por um dos métodos alternativos (imunoenzimático automatizado ou PCR em tempo real), a confirmação pelo método ISO é imperativa prolongando o tempo de resposta.

_Conclusões

Considerando a diversidade de métodos alternativos desenvolvidos nos últimos 20 anos para a deteção de *Salmonella* em alimentos, a escolha da metodologia a utilizar dependerá da situação específica e do objetivo da análise microbiológica.

No contexto deste estudo, consideramos que:

- O método de PCR em tempo real pode ser apropriado para situações em que as matrizes alimentares a testar são de uma só categoria alimentar, se sabe não interferirem com a reação de PCR (ou quando os métodos para a remoção de inibidores, ou para a redução dos seus efeitos são bem conhecidos) e se espera que a maioria das amostras sejam negativas para *Salmonella*.
- O método imunoenzimático automatizado, método validado pela AFNOR, pode ser adequado para testar uma grande diversidade de alimentos quando se espera que a maioria dos resultados seja negativa.
- O método padrão ISO utiliza-se como i) método de referência para todos os tipos de matrizes ii) para os alimentos das categorias incluídas no Regulamento CE N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, sempre que não seja implementado um método validado equivalente, ou iii) como método de referência para confirmar resultados presuntivamente positivos obtidos por qualquer uma das outras metodologias alternativas eleitas.



Referências bibliográficas:

- (1) Hussain MA, Dawson CO. Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. *Foods*. 2013 Dec 12;2(4):585-89. <https://doi.org/10.3390/foods2040585>
- (2) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- (3) Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, et al. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol*. 2016 May;9(3):279-92. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12359>
- (4) Valdivieso-García A, Desruisseau A, Riche E, et al. Evaluation of a 24-hour bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken carcass rinses. *J Food Prot*. 2003 Nov;66(11):1996-2004. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.11.1996>
- (5) Schneid AD, Rodrigues KL, Chemello D, et al. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of Salmonella in chicken meat. *Braz J Microbiol*. 2006 Sep;37(3):350-55. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300027>
- (6) Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, et al. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of Escherichia coli O157:H7, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes pathogen bacteria. *J Agric Food Chem*. 2007 Jun 27;55(13):4933-39. <https://doi.org/10.1021/jf063600b>
- (7) Paniel N, Noguer T. Detection of Salmonella in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods*. 2019 Sep 1;8(9):371. <https://doi.org/10.3390/foods8090371>
- (8) Heymans R, Vila A, van Heerwaarden CAM, et al. Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS One*. 2018 Oct 25;13(10):e0206316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>
- (9) Sahu B, Singh SD, Behera BK, et al. Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR. *Braz J Microbiol*. 2019 Jul;50(3):807-16. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00072-8>
- (10) Crowley E, Bird P, Fisher K, et al. Evaluation of VIDAS Salmonella (SLM) easy Salmonella method for the detection of Salmonella in a variety of foods: collaborative study. *J AOAC Int*. 2011 Nov-Dec;94(6):1821-34. https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011_03
- (11) Dong K, Pan H, Yang D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020 Jan;19(1):149-83. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>
- (12) Hong YJ, Bae YM, Moon B, et al. Inhibitory effect of cinnamon powder on pathogen growth in laboratory media and oriental-style rice cakes (sulgidduk). *J Food Prot*. 2013 Jan;76(1):133-8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-241>
- (13) Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, et al. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*. 2015 Sep 11;7(9):7729-48. <https://doi.org/10.3390/nu7095359>
- (14) Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012 Nov;113(5):1014-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- (15) He X, Carter JM, Brandon DL, et al. Application of a real time polymerase chain reaction method to detect castor toxin contamination in fluid milk and eggs. *J Agric Food Chem*. 2007 Aug 22;55(17):6897-902. <https://doi.org/10.1021/jf0707738>