

# DETECÇÃO DE *Salmonella* EM TOMATES (*Lycopersicon esculentum* MILL) PELOS MÉTODOS FDA-BAM E MINI VIDAS—BIOMÉRIEUX.

Ana Lúcia Penteadó ✉

Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP

Maria Fernanda P. P. M. De Castro

Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP

✉ analucia.penteadó@embrapa.br

## RESUMO

Diversos surtos de *Salmonella* ocasionados pelo consumo de tomate contaminados com este micro-organismo têm sido relatados ultimamente, o que torna primordial a investigação sobre a presença desse patógeno nesse alimento. Métodos que permitam a avaliação rápida da presença de *Salmonella* em alimentos são de suma importância. O objetivo desse estudo foi comparar o método tradicional da *Food and Drug Administration - Bacteriological Analytical Manual* (FDA-BAM) com um método rápido da mini *Vitek Immuno Diagnostic System Assay* (Mini-Vidas-SLM)-bioMérieux, para detecção de *Salmonella* Brazil inoculada artificialmente na superfície de tomates. Foram analisadas 215 amostras de tomates inoculadas artificialmente com *Salmonella* Brazil com níveis de inóculos variando de 0,4 a 940 UFC/tomate. Os resultados obtidos mostraram que os métodos estudados apresentaram uma ótima concordância entre si, para todas as faixas de inóculo analisadas.

**Palavras-chave:** Surtos. Patógenos. Diagnóstico.

## ABSTRACT

*Several outbreaks caused by Salmonella due to consumption of tomato containing this microorganism has been reported lately, which makes essential the evaluation of this pathogen in this food. Methods for the rapid assessment of the presence of Salmonella in food, are of paramount importance. The aim of this study was to compare the traditional method of "Food and Drug Administration- Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM)" with a rapid method of mini Vitek Immuno Assay Diagnostic System (Mini-Vidas-SLM)-bioMérieux to detect Salmonella Brazil artificially inoculated on the surface of tomatoes. Two hundred fifteen (215) tomatoes samples artificially inoculated with Salmonella Brazil with inocula levels ranging from 0.4 to 940 CFU/tomato were analyzed. The results indicated that the studied methods showed an optimum agreement with each other,*

*for all inoculum levels analyzed*

**Keywords:** Outbreaks. .

## INTRODUÇÃO

Pesquisas científicas tem mostrado que uma dieta rica em frutas e vegetais pode proteger contra diversos tipos de câncer e reduz a ocorrência de doença cardíaca coronária. Este fato, aliado com um aumento significativo na disponibilidade destes alimentos durante todo o ano, tem contribuído para um aumento substancial do consumo de frutas e vegetais frescos sobretudo nas duas últimas décadas. No entanto, o aumento nas notificações de surtos de doenças associadas a frutas e legumes frescos ressuscitou, nos órgãos públicos de saúde e consumidores, a importância na segurança destes produtos (CODEX, 2003).

No Brasil, o hábito generalizado de consumir vegetais crus associado a pouca ou nenhuma lavagem dos produtos antes do consumo permite a transmissão de doenças causadas

por bactérias, parasitas e vírus (SIMÕES et al., 2001, KIM, et al., 2007). Estes alimentos são cultivados ao longo do ano, às vezes em camas de solo adubado com esterco animal (SIMÕES et al., 2001), o que pode levar à contaminação por patógenos como a *Salmonella*.

A intoxicação alimentar é normalmente causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados contendo diferentes bactérias, vírus, parasitas ou toxinas de natureza bioquímica ou química (CHEUNG & KAM, 2012).

*Salmonella* spp. é uma das principais causas de intoxicação alimentar e sua detecção, utilizando métodos convencionais, pode levar até 5 dias para confirmar se uma amostra é negativa ou não (CHEUNG & KAM, 2012 e CROWLEY et al., 2011). No caso de triagem, onde se pode esperar uma grande quantidade de resultados negativos, os métodos rápidos podem encurtar significativamente o tempo necessário para obter uma resposta negativa, sendo que para resultado positivo uma etapa de confirmação é adicionalmente necessária (JASSON, et al., 2011). Ensaio imunoenzimático (EIAs) têm o potencial de simplificar e acelerar a detecção. O método VIDAS *Salmonella* (SLM) é um teste EIA automatizado para a detecção de *Salmonella* em alimentos e amostras ambientais que utiliza uma mistura de anticorpos de captura altamente específicos contra os antígenos O e H o qual permite a detecção de cepas de *Salmonella* (CROWLEY et al., 2011).

O equipamento automatizado mini-Vidas (BioMerieux, Vitek, Brasil) permite a realização de ensaios imunoenzimático para a detecção de antígenos de *Salmonella* usando o método ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). O interior dos cones, que servem como fase sólida, são revestidos com anticorpos

anti *Salmonella* adsorvido na sua superfície. Se antígenos de *Salmonella* estão presentes nas amostras os mesmos se ligam aos anticorpos monoclonais anti-*Salmonella* que revestem os seus interiores, os elementos não ligados são eliminados durante os passos de lavagem. Anticorpos conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e dispensados nos cones e vão se ligar aos antígenos de *Salmonella*, que já se encontram fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem removem o conjugado não ligado. Na etapa final de revelação, o substrato (fosfato de 4-metil umbeliferil) é aspirado e depois dispensado no cone, a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência é medida a 450 nm pelo leitor óptico em VIDAS. Os resultados são analisados automaticamente pelo computador e um resultado de teste analítico é impresso para cada teste.

Os testes imunoenzimáticos são amplamente empregados em microbiologia de alimentos, visto apresentarem simplicidade, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem. É importante ressaltar que, até o momento, os métodos imunoenzimáticos para pesquisa de patógenos são considerados métodos de triagem e resultados positivos por este teste devem ser analisados também pelos métodos convencionais (FRANCO & LANDGRAFT, 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de detectar diferentes níveis de células de *Salmonella* Brasil inoculadas artificialmente em superfície de tomate por um método de detecção rápida alternativa (Mini-Vidas-SLM-Biomerieux), comparando-o com um método convencional do Manual Analítico Bacteriológico (MAB), FDA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Comparação da metodologia convencional com a rápida para detecção de *Salmonella* Brasil inoculada na superfície do tomate.

### Cultura bacteriana

Foi utilizada uma cultura pura de *Salmonella* Brasil da coleção do laboratório de microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ.

### Preparo do inóculo

A cepa de *Salmonella* Brasil foi ativada, consecutivamente, em ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid) e incubada a 35°C. Suspensões microbianas foram preparadas com auxílio do equipamento Densimat (bioMerieux) e inoculadas em placas de TSA, com contagem após incubação a 35°C por 24h. As culturas foram diluídas até  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  com contagens correspondentes respectivamente, a  $10^2$ ;  $10^1$  e  $< 10^0$  UFC/ $\mu$ L as quais foram utilizadas para inoculação da superfície de tomates.

### Procedimentos de inoculação

Foram analisados duzentos e quinze tomates, sendo as análises realizadas separadamente em grupos de 5 a 10 tomates em diferentes semanas, todos tomates estavam livres de danos. Com a finalidade de certificar a ausência de *Salmonella* spp, controle negativo, neste alimento foram realizadas análise em cinco tomates, sem inóculo, para cada grupo analisado para este micro-organismo.

No interior de um gabinete de fluxo de ar laminar (VLF -12, VECO) procedeu-se à inoculação na superfície dos tomates com auxílio de uma pipeta automática (Wheaton - Socorex) dispensando 0,1 mL de inóculo por fruto. Os frutos permaneceram na câmara de fluxo laminar até secagem do inóculo. Após esse procedimento os tomates foram colocados individualmente em sacos estéreis, e

acrescentados de caldo de pré-enriquecimento Universal (caldo UP, Difco) em quantidade suficiente para cobrir os frutos os quais foram deixados por 60 minutos à temperatura ambiente e então incubados a 35°C/24horas. Após o período de incubação foram realizadas as análises para detecção de *Salmonella* pelos dois métodos em estudo.

**Detecção de *Salmonella* spp. pelo Método do Manual Analítico Bacteriológico (BAM) do FDA.**

Após incubação do caldo UP foi retirada uma alíquota de 0,1mL e adicionado em 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) da Oxoid com incubação 42,5 ±2°C/24h. Uma alíquota de 1mL do caldo UP também foi adicionado a 10mL de base de caldo de tetrionato (TT, Difco) e deixadas a 37°C durante 24h. Após a incubação, alças de RV e caldo TT foram plaqueados em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Difco) e ágar Hektoen Enteric (HE, Difco) e incubadas a 37°C/24h. Depois foram observadas colônias típicas de *Salmonella* spp nestas placas, que foram subcultivadas em ágar nutriente (NA, Difco). Tubos contendo ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Difco) e ágar Lisina Ferro (LIA, Acumedia) foram utilizados para confirmação presuntiva de colônias que foram confirmados através de testes bioquímicos (API20E-bioMérieux) e sorologia (anti-soro polivalente) de acordo com Andrews et al., (1998).

**Detecção de *Salmonella* spp por Mini Vidas.**

Foram retiradas alíquotas de 1mL do caldo de pré-enriquecimento (UP) e transferido separadamente para 10mL do caldo de tetrionato e caldo de Selenite-Cistina (SC, Difco) com incubação durante 6 horas a 42°C e 35°C respectivamente. Em seguida, 1 mL de cada caldo foi inoculado separadamente em 10 mL de caldo M (bioMérieux 42073) e incubados a 42°C durante 18h. Finalmente, 1mL de cada tubo de caldo de M foi misturado num tubo e aqueceu-se durante 15 ± 1 minutos num banho de água a 95-100°C e realizado o ensaio no equipamento Mini VIDAS como recomendado pelo fabricante. Os resultados positivos foram confirmados utilizando os caldos de enriquecimento (Cistina Selenite ou tetrionato) e os caldos M armazenados a 2-8°C, com isolamento em placas de agar (HE e XLD), seguindo procedimentos padrão.

**Estatística**

Para estimar o grau de concordância entre as técnicas utilizadas foi utilizado o teste estatístico kappa (k), Jekel et al. (2002) e Landis & Koch (1977). O cálculo do teste de diferença significativa (x<sup>2</sup>) foi realizado conforme descrito por Feldsine et al. (2002).

**Obtenção da sensibilidade e especificidade do método teste**

A sensibilidade e especificidade do método em teste foi determinada conforme descrito por Feldsine et al. (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando todos os níveis (0,4 a 940 UFC/tomate) de inóculo analisado (Tabela 1), o método Mini Vidas-SLM apresentou uma sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 83% e 84% quando comparado ao método convencional. O método BAM-FDA detectou uma maior proporção de amostras positivas para *Salmonella* (49%) quando comparado ao método Mini Vidas (41%). O valor k foi de 0,67 e x<sup>2</sup> =0 (< 3,84), o que indica uma ótima concordância entre os métodos avaliados, sem diferença estatística á nível de 5% de significância.

Benetti et al. (2012) realizaram um estudo comparativo entre o método Mini Vidas e métodos tradicionais na detecção de *Listeria* e *Salmonella* em salsichas resfriadas; estes autores encontraram uma sensibilidade e especificidade de respectivamente 100% e 88,89%, quando comparados ao método BAM.

Para níveis de inóculo baixo (Tabela 2), variando de 0,4 a 9,4, a sensibilidade e especificidade para o método Mini Vidas-SLM foi de respectivamente 75 e 85%. O valor k apresentado para esta faixa de inoculo foi de 0,60 e x<sup>2</sup> =0 (< 3,84), o que indica uma ótima concordância entre os métodos avaliados, sem diferença estatística a nível de 5% de significância. O baixo valor de detecção de *Salmonella*, de 36 e 27,2%, respectivamente, para o método FDA-BAM e Mini Vidas-SLM obtido, talvez seja devido a adesão das células deste micro-organismo na superfície de tomate durante

Tabela 1 - Níveis de inóculo de 0,4 a 940 UFC/Fruta.

FDA-BAM	Mini Vidas		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	88	18	106
Negativo	17	92	109
Total	105	110	215

**Tabela 2** - Nível de inóculo de 0,4 a 9,4 UFC/tomate.

FDA-BAM	MiniVidas		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	34	11	47
Negativo	16	64	78
Total	48	77	125

**Tabela 3** - Nível de inóculo de 10,3 a 940 UFC/tomate.

FDA-BAM	Mini Vidas		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	54	7	75
Negativo	21	8	15
Total	61	29	90

a secagem deste alimento com os inóculos no fluxo alimentar. Não pode ser descartada a possibilidade de que as alíquotas de 100µL retiradas das diluições com *Salmonella* para inoculação nos tomates não contivessem esse micro-organismo devido ao seu baixo nível. Shearer et al. (2001), quando utilizaram o método FDA-BAM, encontraram 25 amostras positivas para um total de 36 diferentes amostras de frutas inoculadas artificialmente com 1UFC/25g de *Salmonella* Enteritidis, aproximadamente 69% de recuperação. Crowley et al. (2011), na análise de *Salmonella* inoculada artificialmente em espinafre encontrou uma recuperação de 100%, com os métodos FDA-BAM e Vidas SLM para níveis de inóculo de 2-5 UFC/25g e de aproximadamente 53% para níveis de inóculo de 0,2-2 UFC/25g.

O método BAM-FDA é um dos métodos de referência utilizados no mundo inteiro. No entanto, a crescente demanda na velocidade de detecção, sensibilidade e confiança exige encontrar outros métodos (WANG et al., 2015). Pela análise dos resultados observou-se que os métodos não apresentam diferenças significativas na detecção de *Salmonella* inoculada artificialmente em superfície de tomate.

#### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- BENETTI, TM; MONTEIRO, CLB; BEUX, MR; ABRAHÃO, WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: A comparison with conventional methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.3, p. 791-793, 2013.
- CHEUNG, PY; KAM, KM. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassay, and other rapid detection and quantification methods. **Food Research International**, v.45, p.802-808, 2012.
- CODEX, **Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables**. CAC/RCP 53-p. 1 – 44, 2003.
- CROWLEY, E; BIRD, P; FISHER, K; GOETZ, K; BENZINGER, MJ; AGIN, J; GOINS, R. Evaluation fo VIDAS *Salmonella* (SLM) Easy *Salmonella* Method for the Detection of *Salmonella* in a Variety of Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.94, n.6, p.1821-1834, 2011.
- FELDSINE, P; ABEYTA, C; ANDREWS, WH. AOAC International methods committee guidelines for validation on qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v.85, n.5, 2002.
- FRANCO, BDGM; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo, Atheneu, p. 1-182, 2003.
- JASSON, V; BAERT, L, UYTENDAELE, M. Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella* enteric in chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.488-491, 2011.
- JEKEL, JF; ELMORE, JG; KATZ, DL. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 328.
- KIM, HJ; FONSECA, JM; KUBOTA, C; CHOI, JH. Effect of hydrogen peroxide on quality of fresh-cut tomato. **Journal of Food Science**, v.72, n.7, p.463- 467, 2007.
- LANDIS, JR; KOCH, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33; n.1; p.159-174, 1977.
- SHEARER, AEH; STRAPP, CM; JOERGER, RD. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp, and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v.64, n.6, p.788-795, 2001.
- SIMÕES, M; PISANI, B; MARQUES, EGL; PRANDI, MAG; MARINI, MH; CHIARINI, PFT; ANTUNES, JLF; NOGUEIRA, AP. Hygienic Sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas-SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.331-33, 2001.
- WANG, H; GILL, VS; CHENG, C-H; ESCALONA, NG; IRVIN, KA; ZHENG, J; BELL, RL; JACOBSON, AP; HAMMACK, TS. Evaluation and comparison of rapid methods for the detection of *Salmonella* naturally contaminated pine nuts using different pre enrichment media. **Food Microbiology**, v.46, p.58-65, 2015.