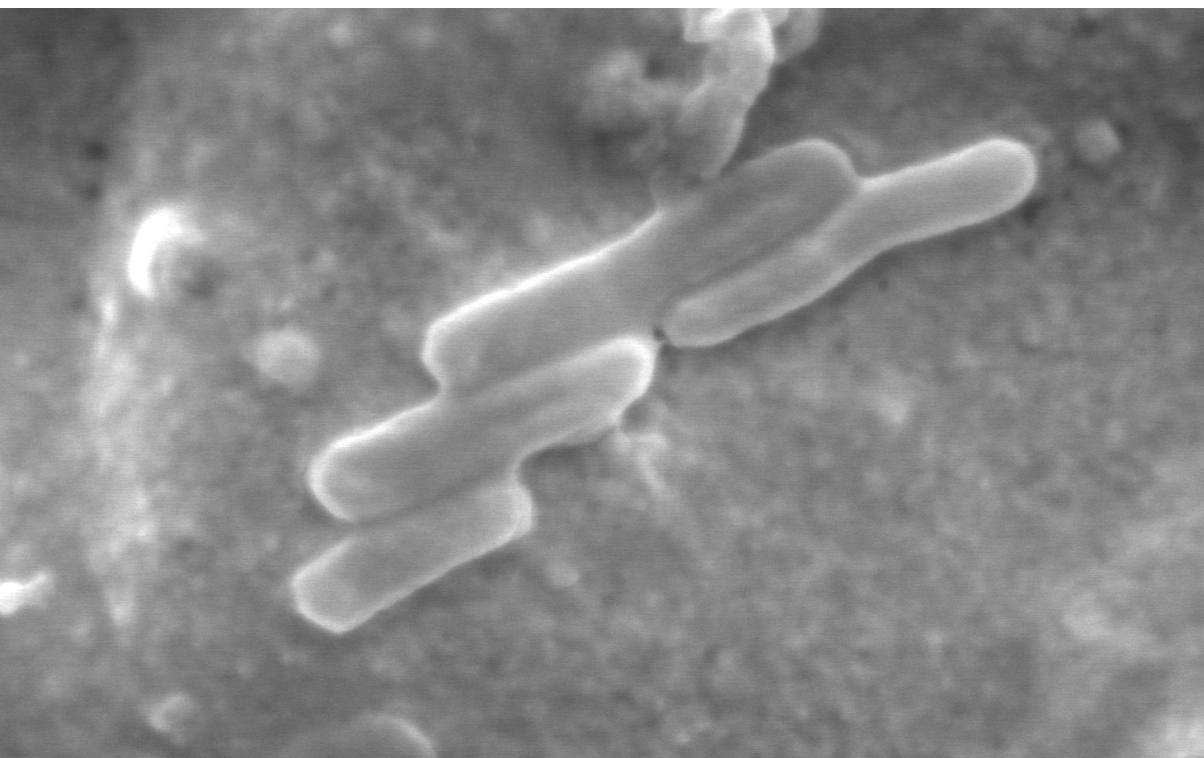


## Métodos Alternativos para Detecção de *Salmonella* em Alimentos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

## **DOCUMENTOS 183**

# Métodos Alternativos para Detecção de *Salmonella* em Alimentos

Aíris Maria Araújo Melo  
Maria de Fatima Borges  
Dalila Lima Alexandre  
Roselayne Ferro Furtado  
Carlucio Roberto Alves  
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

***Embrapa Agroindústria Tropical  
Fortaleza, CE  
2018***

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente  
*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva  
*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa  
*Eveline de Castro Menezes*

Membros  
*Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,  
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner  
Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita  
de Cassia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial  
*Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica  
*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Ariilo Nobre de Oliveira*

Imagem da capa  
*José Valdenir da Silveira - micrografia eletrônica  
de Salmonella Typhimurium (ampliação 25.547x)*

**1ª edição**  
On-line (2018)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

Métodos alternativos para detecção de *Salmonella* em alimentos / Airis Maria  
Araújo Melo et al. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018.

34 p. : il. ; 16 cm x 22 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical,  
ISSN 2179-8184; 183).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Segurança de alimentos. 2. Bactérias. 3. Patógenos. 4. Métodos rápidos.  
I. Melo, Airis Maria Araújo. II. Borges, Maria de Fatima. III. Alexandre, Dalila Lima.  
IV. Furtado, Roselayne Ferro. V. Alves, Carlucio Roberto. VI. Figueiredo, Evânia  
Altina Teixeira de. VII. Série.

CDD 363.192

---

© Embrapa, 2018

## Autores

### **Aíris Maria Araújo Melo**

Bióloga, mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

### **Maria de Fatima Borges**

Farmacêutica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

### **Dalila Lima Alexandre**

Química, graduada pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

### **Roselayne Ferro Furtado**

Bióloga, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

### **Carlucio Roberto Alves**

Químico, doutor em Físico-química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

### **Evânia Altina Teixeira de Figueiredo**

Bióloga, doutora em Microbiologia, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

## Apresentação

De acordo com dados epidemiológicos mundiais, a contaminação por *Salmonella* constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos. A determinação desse patógeno é obrigatória em produtos alimentícios para consumo humano e pode ser realizada por meio de métodos convencionais ou por métodos alternativos, também denominados métodos rápidos.

Neste documento, são apresentados diferentes métodos alternativos, baseados em técnicas moleculares e imunológicas, disponíveis no mercado, e métodos baseados em biossensores para detecção de *Salmonella* em alimentos. Ainda não há um método completo que se aplique a qualquer situação, e conhecer as vantagens e limitações de cada técnica é importante para o direcionamento de novas pesquisas que disponibilizem métodos mais eficientes no que diz respeito a tempo de resposta, portabilidade e miniaturização.

A Embrapa Agroindústria Tropical, ciente da importância da segurança de alimentos, tem realizado estudos para o desenvolvimento de novos métodos de detecção de *Salmonella* em alimentos, em parceria com outras instituições de pesquisa e ensino. Com esta publicação, pretende-se ressaltar a natureza do tema e sua abordagem científica, dispondo a estudantes e profissionais uma revisão atualizada dos principais métodos alternativos comercialmente disponíveis e as pesquisas promissoras para aplicação de biossensores como ferramenta de detecção de patógenos em alimentos.

*Lucas Antonio de Sousa Leite*

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

## Sumário

Introdução.....	6
Categorias de métodos alternativos para detecção de <i>Salmonella</i> .....	8
Moleculares .....	8
Imunológicos .....	12
Biossensores.....	15
Conclusão.....	17
Referências .....	18

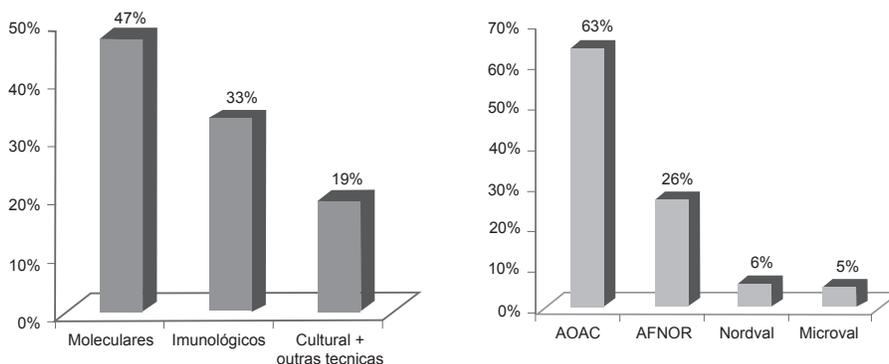
## Introdução

A salmonelose é a doença veiculada por alimentos de maior incidência no mundo. No Brasil, por exemplo, alimentos contaminados por bactérias do gênero *Salmonella* lideraram as estatísticas no período de 2007 a 2016, representando 25 % dos surtos com agentes etiológicos identificados (Brasil, 2016). Nos Estados Unidos, estima-se a ocorrência de 1 milhão de casos, com 19.000 hospitalizações e aproximadamente 380 mortes anualmente (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2012). Na União Europeia são relatados mais de 90.000 casos de salmonelose por ano (*European Food Safety Authority*, 2014).

O teste para detecção de *Salmonella* em alimentos é uma exigência das autoridades sanitárias que regulamentam a segurança de alimentos em seus respectivos países. As técnicas convencionais, baseadas em métodos culturais clássicos, são consideradas sensíveis e confiáveis: no entanto, dependem de uma sequência complexa de etapas e requerem vários dias para o resultado (Andrews et al., 2016). Os avanços recentes em tecnologias para detecção e identificação de microrganismos disponibilizaram alternativas mais rápidas, sensíveis e específicas em relação aos métodos convencionais. Esses são, geralmente, referidos como métodos “rápidos” ou alternativos, termos geralmente usados para descrever uma variedade de testes que incluem *kits* bioquímicos miniaturizados, ensaios imunológicos, testes baseados em DNA/RNA e combinações com métodos culturais.

A automatização, portabilidade e possibilidade de analisar múltiplas amostras ao mesmo tempo são características que vêm despertando o interesse principalmente das indústrias. Os setores de qualidade e de segurança de alimentos têm demandado às instituições de validação a aprovação de diversos métodos alternativos para detecção de patógenos em alimentos. A Segurança e o Serviço de Inspeção de Alimentos, *Food Safety and Inspection Service* (FSIS), pertence ao Departamento de Agricultura dos EUA e detém a responsabilidade de garantir a oferta segura e saudável de produtos alimentícios, o que inclui a sua correta embalagem e rotulagem. A *Food Safety and Inspection Service* (2016) divulga a relação de testes e *kits* que foram validados por organizações independentes para serem utilizados na detecção dos principais agentes patogênicos veiculados por

alimentos. A referida lista é apenas informativa e não endossa ou recomenda o uso de qualquer método em particular. Estão listados, atualmente, 126 kits comerciais que aplicam diferentes técnicas de detecção. A maioria, 47%, baseiam-se em técnicas moleculares, seguidos pelos ensaios imunológicos, que compreendem 33%, enquanto 19% baseiam-se em métodos culturais combinados com técnicas bioquímicas ou imunológicas (Figura 1). Um critério importante para a comercialização desse tipo de produto é a validação. Dos kits listados pela *Food Safety and Inspection Service* (2016), 63% possuem validação pela organização norte-americana AOAC, 26% pela organização francesa AFNOR, 6% pela nórdica NordVal e 5% pela europeia MicroVal (Figura 1).



**Figura 1.** Kits para detecção de patógenos veiculados por alimentos validados por organizações independentes.

Fonte: *Food Safety and Inspection Service*, 2016.

Legenda: AOAC – Association of Official Analytical Chemists; AFNOR – Association Française de Normalisation; NordVal – Nordic Validation International; Microval – European validation alternative microbiological analyses of food and beverage.

Nos últimos anos, os biossensores têm ganhado maior visibilidade por apresentarem respostas rápidas, um grande potencial para miniaturização e portabilidade. Já existem exemplos de aplicação em diferentes áreas, como no controle de qualidade em indústrias de alimentos e bebidas (Mello; Kubota, 2002); na detecção de patógenos em alimentos e em água (Lazcka et al., 2007; Leonard et al., 2003; Melo et al., 2016b; Melo et al., 2016c; Nayak

et al., 2009; Velusamy et al., 2010) na detecção de fitopatógenos (Skottrup et al., 2008), dentre outras.

Apesar das inquestionáveis vantagens, os métodos alternativos apresentam algumas limitações que precisam ser observadas antes de sua aplicação. A maioria das técnicas não apresenta a sensibilidade e a especificidade necessárias para a realização do ensaio direto, requerendo uma etapa de enriquecimento da amostra, o que aumenta o tempo de análise em aproximadamente 24 horas. Em alguns casos, a eficiência do método é garantida apenas em um alimento específico, já que os componentes da matriz (gorduras, proteínas complexas, antibióticos, hormônios, por exemplo) interferem no funcionamento e, conseqüentemente, no desempenho do método. Nesses casos, são necessários estudos de desempenho em vários alimentos para definir o campo de aplicação da metodologia.

O desenvolvimento de métodos alternativos para detecção de *Salmonella* é de grande importância para a segurança dos alimentos e para a manutenção da saúde pública. Além disso, há uma forte demanda industrial para o atendimento da legislação e da rápida liberação de produtos alimentícios para o mercado. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de sumarizar os principais métodos alternativos para a detecção de *Salmonella*, com base nas técnicas empregadas, apresentando as vantagens e as limitações de suas aplicações.

## Categorias de métodos alternativos para detecção de *Salmonella*

### Moleculares

Os testes moleculares utilizam uma sequência específica dos ácidos nucleicos bacterianos como alvo para a detecção e representam 47% (59 kits) dos métodos validados, segundo a FSIS (Figura 1). É a categoria de métodos alternativos que mais cresceu nos últimos anos. O ensaio de PCR, *Polymerase Chain Reaction*, é o teste molecular mais usado na detecção de *Salmonella* em alimentos. Trata-se de uma técnica altamente sensível que foi inicialmente desenvolvida por Kary B. Mullis em 1985 (Lee et al., 2015).

Baseia-se na amplificação enzimática de segmentos específicos de DNA *in vitro*, que permite obter milhares de cópias a partir de uma única sequência de ácido nucleico, dentro de duas ou três horas. Os produtos amplificados podem ser detectados por diversas técnicas, como, por exemplo, sistemas à base de gel de agarose, géis de poliacrilamida ou marcadores fluorescentes.

O sistema de PCR em tempo real ou qPCR é uma inovação tecnológica da PCR convencional, representando 83% dessa categoria (49 *kits*) (FSIS, 2016). A qPCR tem a capacidade de gerar resultados quantitativos, permitindo que se acompanhe a reação de amplificação de forma mais rápida e precisa. A sequência-alvo amplificada pode ser detectada pelo aumento do sinal de fluorescência produzido de forma diretamente proporcional ao número de sequências amplificadas (amplicons). O aumento na intensidade da fluorescência é captada pelas câmaras do termociclador em tempo real.

O método foi melhorado por meio da automatização nas etapas de extração do DNA, amplificação e detecção, o que acelerou a capacidade de resposta dos laboratórios para um diagnóstico emergencial de *Salmonella* numa ampla variedade de matrizes de alimentos. Dispõe-se, atualmente, de uma grande diversidade de testes comerciais validados que utilizam a técnica de qPCR. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de *kits* utilizados na detecção de *Salmonella* baseados em qPCR, que aplicam principalmente duas tecnologias: a SYBRgreen PCR e 5'-3' nuclease da Taq polimerase. Dentre as vantagens da qPCR estão facilidade de quantificação; maior sensibilidade, reprodução e precisão; maior rapidez; maior controle do processo; e menor risco de contaminação.

O ensaio de hibridização com sonda de DNA também é bastante utilizado para detecção de bactérias. Representa 16% (9 *kits*) dos testes moleculares comercialmente disponíveis e validados para a detecção de *Salmonella* (Food Safety and Inspection Service, 2016). A técnica baseia-se na utilização de uma sonda de DNA com uma sequência complementar à sequência-alvo do DNA da bactéria. As células-alvo são lisadas e os ácidos nucleicos liberados são purificados, para a posterior hibridização com uma sonda de DNA. As sondas não ligadas são eliminadas por lavagem do sistema. O híbrido estável com o DNA marcado pode ser detectado por meio de técnicas diferentes, tais como radioisótopos ou reações enzimáticas.

Os ensaios de hibridização com sondas de DNA apresentam alta especificidade e sensibilidade e são eficazes para rastrear rapidamente um grande número de amostras. A ocorrência de reações cruzadas nesses testes é bastante reduzida. No entanto, todos os testes exigem uma etapa de pré-enriquecimento da amostra para alcançar a concentração adequada à sensibilidade do método. Os ensaios colorimétricos de hibridização de DNA disponíveis no mercado têm um tempo médio de análise de 48 horas. Os resultados são presuntivos e os positivos devem ser confirmados pelos métodos convencionais.

**Tabela 1.** Listagem de testes moleculares comercialmente disponíveis para detecção de *Salmonella* em alimentos.

Nome comercial	Fabricante	Técnica	Aplicação
3M™ Molecular Detection Assay <i>Salmonella</i>	3M Health Care	qPCR1	Alimentos para humanos (exceto pimentas, ervas aromáticas, cafés instantâneos e chás, cubos de caldo/concentrados, leite em pó, cacau em pó) e amostras ambientais (exceto ambientes de produção primária)
ADIAFOOD <i>Salmonella</i>	AES Chemunex	qPCR	Alimentos para humanos e animais, utensílios e amostras ambientais (exceto ambientes de produção primária)
ANSR™ for <i>Salmonella</i>	Neogen Corporation	qPCR	Carne moída crua, salsichas (25 g, 325 g), enxágue de carcaça de frango (30 mL), peru moído cru, cereais de aveia, superfícies (aço inoxidável, plástico, concreto selado, telha cerâmica, borracha)
Assurance GDS® <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	qPCR + IMS2	Alimentos para humanos e animais e amostras ambientais
BAX® System PCR Assay <i>Salmonella</i> spp. (automated)	DuPont Qualicon	qPCR	Alimentos para humanos e animais, amostras ambientais (exceto ambientes de produção primária)
Colorimetric GENE-TRAK <i>Salmonella</i> Assay	GENE-TRAK Systems/Neogen Corp	Hibridização de DNA	Todos os tipos de alimentos

Continua.

**Tabela 1.** Continuação.

Nome comercial	Fabricante	Técnica	Aplicação
"Foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit	BIOTECON Diagnostics GmbH	Hibridização de DNA	Alimentos e amostras ambientais (100 cm <sup>2</sup> )
GeneDisc STEC & <i>Salmonella</i> spp.	Pall GeneDisc Technologies	qPCR	Carne fresca moída crua, guarnição fresca de carne crua
GeneQuence® <i>Salmonella</i>	Neogen Corporation	Hibridização de DNA	Carne crua de peru, ovos (desi-dratados, líquidos e pasteurizados congelados), leite achocolatado, ração seca
Pathatrix® Auto <i>Salmonella</i> spp. Kit Linked to selective agar detection	Life Technologies	Enriquecimento seletivo + + IMS + qPCR	Produtos de carne cozidos e carne bovina crua, leite pasteurizado e produtos lácteos

Fonte: *Food Safety and Inspection Service*, 2016 1 – PCR em tempo real; 2 Immunomagnetic Separation.

Existem testes de RNA com nível de sensibilidade de 97,1% (Lee et al., 2015). Esses, por sua vez, utilizam um procedimento com dois estágios, incluindo 24 e 27 horas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, seguido por um tempo de teste de 2 horas no alimento selecionado (*Food Safety and Inspection Service*, 2016). Tais ensaios baseiam-se em sequências de RNA ribossômico (rRNA). Essa abordagem de hibridização de rRNA tem certos benefícios na concepção de uma sonda. Uma delas é que as sequências de rRNA são altamente conservadas, estáveis e abundantes em uma célula bacteriana, proporcionando vários alvos e aumentando a sensibilidade dos ensaios.

Na última década, a categoria de ensaios moleculares foi mais intensamente explorada e desenvolvida para detecção de *Salmonella*. Dentre as vantagens dos testes moleculares estão a sensibilidade, especificidade e possibilidade de combinação com outros métodos, permitindo identificação mais rápida sem a necessidade da obtenção de culturas puras. Como consequência disso, há testes moleculares capazes de detectar uma única sequência de DNA numa amostra de alimento. Devido à capacidade de detectar baixas concentrações, os tempos de enriquecimento são consideravelmente mais

curtos e conseguem alcançar os níveis necessários para uma detecção confiável pelos métodos de PCR.

Dentre os testes moleculares, os de PCR mostram especificidade e sensibilidade comparáveis aos métodos convencionais. Ensaios baseados em PCR podem fornecer o nível de sensibilidade de 10<sup>4</sup> UFC (unidades formadoras de colônias) mL<sup>-1</sup> (Lee et al., 2015), níveis geralmente alcançados após o pré-enriquecimento da amostra. A sensibilidade e a especificidade destes métodos dependem em grande parte da microbiota da amostra, da matriz do alimento, da presença de células não cultiváveis e da presença de substâncias inibidoras (por exemplo, gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos). No entanto, tais testes não são capazes de diferenciar bactérias viáveis de inviáveis, ou até mesmo a presença de uma toxina, já que são específicos para a identificação dos genes, mesmo que não estejam sendo expressos (Feng et al., 2010).

## Imunológicos

Os testes alternativos baseados em ensaios imunológicos empregam anticorpos mono ou policlonais para a detecção de *Salmonella*. Tais anticorpos são capazes de reconhecer antígenos (somáticos, flagelares ou capsulares) em uma variedade de matrizes de alimentos. Os ensaios imunológicos incluem, principalmente, o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), testes de aglutinação em látex e ensaios de imunodifusão (Tabela 2).

**Tabela 2.** Testes imunológicos comercialmente disponíveis para detecção de *Salmonella* em alimentos.

Nome comercial	Fabricante	Técnica	Aplicação
3M™ TECRA™ <i>Salmonella</i> Visual	3M Microbiology	ELISA	Todos alimentos
Assurance Gold EIA <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	ELISA	Todos alimentos
BioControl 1-2 TEST	BioControl Systems, Inc.	Imunodifusão	Todos alimentos
LOCATE® <i>Salmonella</i> Assay Kit	Rhone-Poulenc	ELISA	Todos alimentos

Continua.

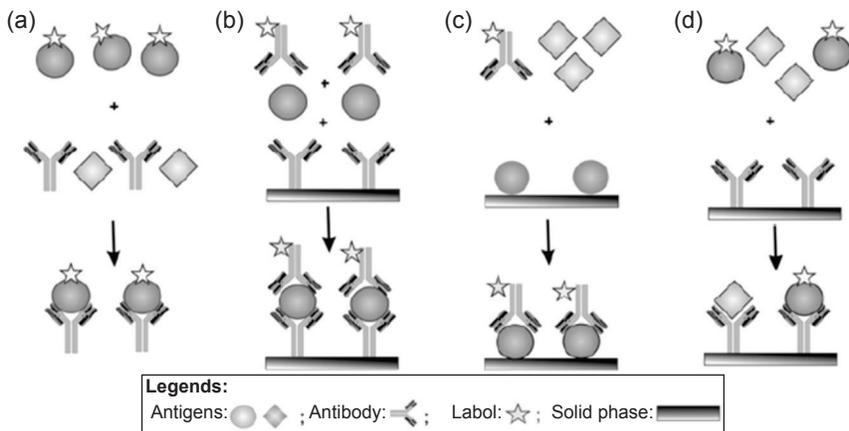
**Tabela 2.** Continuação.

Nome comercial	Fabricante	Técnica	Aplicação
<i>Salmonella</i> ELISA Test SELECTA, RayAI <i>Salmonella</i> SELECTA	Diatek AG	ELISA	Todos alimentos para humanos e animais
<i>Salmonella</i> -Tek ELISA Test System	Organon Teknika Corp.	ELISA	Todos alimentos
Singlepath® <i>Salmonella</i>	Merck KgaA	Imunocromatográfico	Leite em pó desnatado, carne moída crua, carne de peru moída, camarão descascado cozido congelado, coco seco, pimenta preta, ração
TAG 24 <i>Salmonella</i>	BioControl Systems, Inc.	ELISA	Todos os alimentos para humanos e animais
FoodChek <i>Salmonella</i>	FoodChek System Inc.	Imunoensaio de fluxo lateral	Ovos líquidos, ovos com casca, clara de ovo líquida, ovos em pó, gema de ovo em pó, aço inoxidável, plástico, borracha, telhas de cerâmica, concreto selado
VIP Gold for <i>Salmonella</i> Assay	BioControl Systems, Inc.	Imunoensaio de fluxo lateral	Todos alimentos
TRANSIA® PLATE <i>Salmonella</i> Gold	BioControl Systems, Inc.	ELISA	Todos alimentos para humanos e animais, amostras ambientais
VIDAS® Easy <i>Salmonella</i>	bioMérieux, S.A.	ELISA	Todos alimentos para humanos e animais, amostras ambientais (exceto ambiente agrícola)

Fonte: *Food Safety and Inspection Service*, 2016.

O teste ELISA é o mais utilizado, nesta categoria, para a detecção de *Salmonella*. Está comercialmente disponível uma grande quantidade de *kits* (*Food Safety and Inspection Service*, 2016) baseados em diferentes formatos de ELISA (Figura 2). No imunoensaio do tipo homogêneo (Figura 2a) os anticorpos e os antígenos marcados são misturados livremente no sistema de detecção. Quando os antígenos ligam-se aos anticorpos, ocorre uma mudança na atividade do marcador, normalmente evidenciado pela mudança de cor da amostra avaliada.

Os imunoenaios são normalmente heterogêneos (Figura 2b,c,d) nestes, um antígeno específico de *Salmonella* liga-se ao seu respectivo anticorpo que se encontra imobilizado em uma matriz sólida. A formação do complexo antígeno-anticorpo pode ser verificada pela alteração na cor causada pela clivagem enzimática de um substrato cromogênico, permitindo evidenciar a detecção da bactéria na amostra avaliada. Os imunorreagentes, componentes do ensaio não ligados são removidos por lavagens, e a resposta é obtida a partir dos marcadores ligados, sendo proporcional à quantidade de analito presente na amostra.



**Figura 2.** Formatos de ELISA: (a) esquema homogêneo (b) heterogêneo não competitivo (c) (d) heterogêneos competitivos.

Fonte: Ramirez et al. (2009).

Os imunoenaios também podem ser competitivos (Figura 2b) ou não competitivos (Figura 2c,d). Os mais usados em laboratórios são os que utilizam o método sanduíche e o método de imunoenensaio competitivo. No imunoenensaio sanduíche não competitivo, os anticorpos (primários) estão imobilizados em uma superfície. Após a adição da amostra com o antígeno, um anticorpo conjugado marcado é adicionado ao sistema. Num ensaio competitivo, a competição acontece entre o anticorpo marcado livre (numa quantidade limitada) e o antígeno fixado a uma base, ou entre o antígeno marcado (amostra) e uma quantidade limitada de anticorpos.

A técnica de aglutinação emprega partículas de látex revestidas com anticorpos que reagem com os antígenos da superfície das células de *Salmonella*, formando agregados visíveis para identificação das amostras positivas. Os ensaios são específicos, de fácil manipulação e confiáveis. Em geral, eles têm sido utilizados como uma técnica de análise confirmatória, em vez de teste de triagem, como os demais. Existem vários kits comerciais disponíveis no mercado que utilizam essa técnica (*Food Safety and Inspection Service*, 2016).

Na técnica que emprega reação de imunodifusão destaca-se o *kit 1-2 Test*<sup>®</sup> (Biocontrol). Trata-se de um dispositivo com duas câmaras: a primeira é a de inoculação, onde se adiciona a amostra de alimento pré-enriquecida, e a segunda é a de motilidade, onde ocorrem o crescimento bacteriano e a reação com os anticorpos flagelares. Antes da inoculação, a amostra é pré-enriquecida durante 24 horas. A amostra enriquecida é inoculada na câmara de inoculação. As células de *Salmonella* inoculadas movem-se para a câmara de motilidade, onde se forma o complexo antígeno-anticorpo. O resultado positivo é evidenciado pela formação de uma imunobanda tridimensional visível após um tempo médio de 24 a 30 horas de incubação (*AOAC Official Method 989.13*, 1998).

Os ensaios imunológicos são comparativamente mais rápidos e mais específicos do que os métodos convencionais. Quando associados às técnicas como a de separação imunomagnética (IMS), com possibilidade de automatização, torna-se mais rápido e prático, especialmente para amostras em grandes quantidades. Dentre os imunoenaios, os que se baseiam em ELISA mostram especificidade e sensibilidade comparáveis aos métodos convencionais e são os mais utilizados. Ensaios de ELISA apresentam limites de detecção em torno de  $10^4$  -  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, níveis geralmente alcançados após o pré-enriquecimento da amostra (Lee et al., 2015).

No entanto, esses métodos têm algumas limitações para detecção de *Salmonella*. A necessidade de uma etapa prévia de enriquecimento da amostra para obter o número adequado de células aumenta o tempo de análise. Além disso, podem ocorrer reações cruzadas com antígenos de espécies filogeneticamente próximas, variações de antígeno, limites de sensibilidade para algumas matrizes de amostras e alto custo para automação dos testes. A sensibilidade e especificidade desses métodos dependem em grande parte

da microbiota da amostra, da complexidade da matriz do alimento e das substâncias inibidoras (por exemplo, gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos).

## Biossensores

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos capazes de detectar analitos (espécies químicas e/ou biológicas) rapidamente, tanto quantitativamente como qualitativamente (Furtado et al., 2008). Esses dispositivos são formados por dois componentes principais, um biorreceptor, molécula que interage especificamente com o analito, e um transdutor, que converte a resposta da interação biorreceptor-analito em um sinal elétrico.

Existem diferentes tipos de transdutores, os mais utilizados são: ópticos, piezoelétricos e eletroquímicos. Os biossensores com transdutores eletroquímicos têm sido relatados com maior frequência na detecção de patógenos (Arora et al., 2013). Esses são amplamente usados em diferentes áreas e surgem como uma alternativa de resposta rápida para a detecção de bactérias patogênicas (Velusamy et al., 2010). Estudos recentes têm relatado o desenvolvimento de biossensores capazes de detectar a presença de microrganismos ou seus metabólitos (toxinas) de uma forma rápida e precisa com menor limite de detecção do que os métodos convencionais.

A evolução no desenvolvimento de biossensores vem sendo favorecida pelo aumento da compreensão molecular e bioquímica da resposta analítica e das suas respectivas tecnologias de suporte. Por essas razões, é possível encontrar hoje dispositivos miniaturizados, de custo acessível e de fácil uso. Existem atualmente diferentes tipos de biossensores que são classificados pelo tipo de moléculas biológicas imobilizadas (genossensores, imunossensores), pela interação com o analito (catalítica ou enzimática), por meio da resposta analítica (direto ou indireto), ou pelo transdutor (eletroquímico, óptico ou piezoelétrico).

Melo et al. (2016a) realizaram um estudo sobre imunossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção de *Salmonella*, cujos limites e tempos de detecção dos dispositivos são apresentados na Tabela 3. Em uma rápida comparação com os métodos moleculares e imunológicos, os imunossensores se sobressaem em relação ao tempo de detecção. Podemos

observar na Tabela 3 a rapidez de resposta dos dispositivos, com tempos de detecção de até 6 minutos, e baixos limites de detecção, com dispositivos capazes de detectar até três células mL<sup>-1</sup>. Esses resultados são alcançados sem necessidade de enriquecimento da amostra, etapa necessária nos métodos moleculares e imunológicos previamente apresentados.

**Tabela 3.** Relação de imunossensores eletroquímicos para detecção de *Salmonella*.

Técnica	Limite de detecção	Tempo de detecção	Referências
Impedimétrico	10 UFC mL <sup>-1</sup>	3 h	Pournaras et al. (2008)
	5 x 10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	6 min	Nandakumar et al. (2011)
	10 <sup>5</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	2 h	Mantzila et al. (2008)
	5 x 10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	1 h	Dong et al. (2013)
	10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	40 min	Yang et al. (2009)
	3 células mL <sup>-1</sup>	Não relatado	Ma et al. (2014)
Amperométrico	6 UFC mL <sup>-1</sup>	Não relatado	Zhu et al. (2014)
	10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	3 h	Delibato et al. (2006)
	143 células mL <sup>-1</sup>	1,5 h	Afonso et al. (2013)
	20 células mL <sup>-1</sup>	Não relatado	Salam; Tothil (2009)
	5 x 10 <sup>3</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	50 min	Liébana et al. (2009)
	1,95 x 10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Não relatado	Hu et al. (2014)
	13 células mL <sup>-1</sup>	1 h	Freitas et al. (2014)
	5 x 10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	1 h	Brandão et al. (2013)
	10 UFC mL <sup>-1</sup>	125 min	Melo et al. (2016c)
Condutimétrico	7,9 x 10 UFC mL <sup>-1</sup>	10 min	Muhammad-Tahir, Alocilja (2003)
Potenciométrico	119 UFC mL <sup>-1</sup>	Não relatado	Dill et al. (1999)

Fonte: Melo et al. (2016a).

Melo et al. (2016c) desenvolveram um imunossensor capaz de detectar *Salmonella* de forma rápida, específica e com um baixo limite de detecção. Nesse estudo, foi aplicada a técnica de monocamadas auto-organizadas para modificar a superfície de eletrodos de ouro, usando-se o tiol cisteamina. A

Proteína A foi utilizada para a imobilização orientada do anticorpo primário por meio de ligações covalentes. A curva de resposta do biossensor apresentou um comportamento qualitativo com limite de detecção de apenas 10 UFC mL<sup>-1</sup> e com tempo de detecção de 125 min. Ademais, testes de reação cruzada frente às cepas de *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* evidenciaram uma alta especificidade do dispositivo desenvolvido. A aplicabilidade do imunossensor em alimentos já foi comprovada em amostras de leite (Melo et al. 2016c), podendo ser avaliada em outras matrizes de alimentos.

Os métodos alternativos são concebidos para a detecção de um alvo específico. Essa característica os torna mais adequados para aplicação no controle de qualidade e em segurança de alimentos. Nesse processo, normalmente, são realizadas triagens rápidas em um grande número de amostras, buscando detectar um analito específico. No entanto, os resultados positivos detectados por métodos alternativos são considerados apenas presuntivos, necessitando obrigatoriamente de confirmação por um método padrão oficial.

Os métodos alternativos só poderão ser utilizados se estiverem aprovados por instituições independentes para validação de métodos (AOAC, AFNOR, MicroVal, NordVal) ou órgãos reguladores (FSIS, FDA BAM, EFSA, ANVISA, ISO). E, além disso, devem ser utilizados apenas nas matrizes de alimentos para os quais foram aprovados, seguindo todas as condições validadas, para garantir a qualidade e a confiabilidade do método.

## Conclusões

O mercado dispõe de uma grande variedade de métodos alternativos para detecção de Salmonella baseados em diferentes técnicas de detecção. Dentre estas, destacam-se as técnicas moleculares, com uma representatividade de 47% dos métodos aqui apresentados, e isso se deve à sua elevada especificidade e sensibilidade. Dentre os testes moleculares, 83% utilizam qPCR como técnica de detecção e se destacam pela sua característica quantitativa. Os testes imunológicos representam 33% e o seu desenvolvimento vem se reduzindo quando comparado aos moleculares, principalmente pelos riscos de reações cruzadas com antígenos filogeneticamente próximos. Os biossensores são a categoria de maior desenvolvimento nos últimos

anos e podem empregar tanto técnica moleculares como imunológicas no bioreconhecimento, com a grande vantagem de não requerer o pré-enriquecimento da amostra. A rapidez de resposta dos biossensores aliada à portabilidade e à miniaturização torna essa categoria bastante promissora para aplicação industrial na detecção de bactérias em alimentos.

## Referências

- AFONSO, A.; PEREZ-LOPEZ, B.; FARIA, R. C.; MATTOSO, L.; HERNANDEZ-HERRERO, M.; ROIG-SAGUES, A.; MALTEZ-DA COSTA, M.; MERKOCI, A. Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, n. 1, p. 121-126, 2013.
- ANDREWS, W. H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) on line**. FDA 2016. Chap. 5. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2017.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists International. AOAC Official Method 989.13, 1998. Disponível em: [http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main\\_page=product\\_info&cPath=1&products\\_id=893](http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=893). Acesso em: 10 set. 2017.
- ARORA, P.; SINDHU, A.; KAUR, H.; DILBAGHI, N.; CHAUDHURY, A. An overview of transducers as platform for the rapid detection of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 1829-1840, 2013.
- BRANDÃO, D.; LIÉBANA, S.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, P.; CAMPOY, S.; CORTÉS, M. I. Electrochemical magneto-immunosensing of *Salmonella* based on nano and micro-sized magnetic particles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 421, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Pathogens causing US foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths, 2000–2008**. 2012. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/pathogens-complete-list-01-12.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2017.
- DELIBATO, E.; VOLPE, G.; STANGALINI, D.; DEMEDICI, D.; MOSCONE, D.; PALLESCI, G. Development of SYBR-green real-time PCR and a multichannelelectrochemical immunosensor for specific detection of *Salmonella* enterica. **Analytical Letters**, v. 39, n. 8, p. 1611-1625, 2006.

DILL, K.; STANKER, L. H.; YOUNG, C. R. Detection of *Salmonella* in poultry using a silicon chip- based biosensor. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 41, n. 1, p. 61-67, 1999.

DONG, J.; XU, M.; MAA, Q.; AI, S.; ZHAO, H. A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of *Salmonella* Typhimurium in milk. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1980-1986, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **EFSA explains zoonotic diseases**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/factsheetSalmonella>>. 2014. Acesso em: 10 abr. 2017.

FENG, P. Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) on line**. FDA 2010. Appendix 1. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. United States Department of Agriculture. **Foodborne Pathogen Test Kits Validated by Independent Organizations** Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/f97532f4-9c28-4ecc-9aee-0e1e6cde1a89/Validated-Test-Kit-Spreadsheet.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

FREITAS, M.; VISWANATHAN, S.; NOUWS, H.; OLIVEIRA, M.; DELERUE-MATOS, C. Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella* Typhimurium. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 195-200, 2014.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 21 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 117). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33970/1/Dc-117.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

HU, C. M.; DOU, W.; ZHAO, G. Enzyme immunosensor based on gold nanoparticles electroposition and Streptavidin-biotin system for detection of *S. pullorum* & *S. gallinarum*. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 239-245, 2014.

LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F. J.; MUNOZ, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1205-1217, 2007.

LEE, K.-M.; RUNYON M.; HERRMAN, T. J.; HSIEH, J.; PHILLIPS, R. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 32, p. 3-13, 2003.

LIÉBANA, S.; LERMO, A.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; CAMPOY, S.; CORTÉS, M. P. Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 510-513, 2009.

MA, X.; JIANG, Y.; JIA, F.; CHEN, J.; WANG, Z.; YU, Y. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of *Salmonella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 98, n. 1, p. 94-98, 2014.

MANTZILA, A. G.; MAIPA, V.; PRODRONIDIS, M. I. Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella* Typhimurium in milk. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 1169, 2008.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, p. 237-256, 2002.

MELO, A.; ALEXANDRE, D.; FURTADO, R.; BORGES, M.; FIGUEIREDO, E. A.; BISWAS, A.; CHENG, H.; ALVES, C. Electrochemical immunosensors for *Salmonella* detection in food. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5301-5312, 2016a.

MELO, A. M. A.; ALEXANDRE, D. L.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. de F.; ALVES, C. R.; FIGUEIREDO, E. A. T. de **Etapas de montagem e funcionamento de um imunossensor amperométrico para detecção de *Salmonella***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016b. 21 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 110). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139835/1/BPD16001.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2017.

MELO, A. M. A.; ALEXANDRE, D. L.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. de F.; ALVES, C. R.; FIGUEIREDO, E. A. T. de **Detecção de *Salmonella* sp. em leite utilizando biossensor eletroquímico**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016c. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 224). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/161503/1/COT16008.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

MUHAMMAD-TAHIR, Z.; ALOCILJA, E. C. A conductometric biosensor for biosecurity.

**Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 813-819, 2003.

NANDAKUMAR, V.; BISHOP, D.; ALONAS, E.; LABELLE, J.; JOSHI, L.; ALFORD, T. I. A Low-Cost Electrochemical Biosensor for Rapid Bacterial Detection. **IEEE Sensors Journal**, v. 11, n. 1, p. 210-216, 2011.

NAYAK, M.; KOTIAN, A.; MARATHE, S.; CHAKRAVORTTY, D. Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 661-667, 2009.

POURNARAS, A.V.; KORAKI, T.; PRODRROMIDIS, M.I. Development of an impedimetric immunosensor based on electropolymerized polytyramine films for the direct detection of *Salmonella* Typhimurium in pure cultures of type strains and inoculated real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, p. 301-307, 2008.

RAMIREZ, N. B.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 227-249, 2009.

SALAM, F.; TOTHILL, I. E. Detection of *Salmonella* typhimurium using an electrochemical immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 8, p. 2630-2636, 2009.

SKOTTRUP, P. D.; NICOLAISEN, M.; JUSTESEN, A. F. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 3, p.339-348, 2008.

VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.

YANG, G.-J.; MENG, W.-J.; SHEN, M.; HUANG, J.-L.; JIAO, X.-A. A reusable capacitive immunosensor for detection of *Salmonella* spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 2, p. 159-166, 2009.

ZHU, D.; YAN, Y.; LEI, P.; SHEN, B.; CHENG, W.; JU, H. DING, S. J. A novel electrochemical sensing strategy for rapid and ultrasensitive detection of *Salmonella* by rolling circle amplification and DNA-AuNPs probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 846, p. 44-50, 2014.

**Embrapa**

---

***Agroindústria Tropical***

MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

