

# PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* EM ALIMENTOS<sup>1</sup>

Regina Baptista dos REIS<sup>2,\*</sup>, Elsa M. MAMIZUKA<sup>3</sup>, Bernadette Dora Gombossy de Melo FRANCO<sup>4</sup>

## RESUMO

A metodologia convencional utilizada para detecção de *Salmonella* em alimentos é trabalhosa, apresenta custo elevado e os resultados definitivos somente estão disponíveis após 96 horas. Vários métodos rápidos têm sido propostos, sendo os testes imunoenzimáticos os mais empregados. Este estudo relata o desenvolvimento de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos, empregando-se um anti-soro policlonal monovalente contendo aglutininas f,g,s, não absorvido, e um anti-soro polivalente absorvido contendo as aglutininas e,h; 1,6; i; 1,2; f,g,s e m,t. A eficiência foi comparada com a da metodologia de cultivo tradicional. O teste imunoenzimático foi empregado para a detecção de *Salmonella* em amostras de alimentos infantis experimentalmente inoculadas com este patógeno e com outras enterobactérias, em diferentes proporções. O teste imunoenzimático revelou-se significativamente mais sensível que o método de cultivo. Esse mesmo teste, utilizando-se o anti-soro f,g,s não absorvido com antígenos heterólogos revelou concordância de 89,6% com o método de cultivo e sensibilidade de 100,0%. Por outro lado, empregando-se o anti-soro polivalente absorvido, a concordância com o método de cultivo foi de 81,3% embora a sensibilidade tenha se mantido no mesmo nível. O desempenho do teste imunoenzimático empregando-se um desses dois anti-soros indica um grande potencial de aplicação como método de triagem na detecção de *Salmonella* em alimentos.

**Palavras-chave:** detecção; *Salmonella*; teste imunoenzimático; alimentos.

## SUMMARY

STANDARDIZATION OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF *Salmonella* IN FOODS. The conventional method for detection of *Salmonella* in foods is cumbersome, it is not cost-effective and results are available only after 96h. Many alternative rapid methods have been already proposed and enzyme immunoassays are the most common. This study reports the standardization of a new enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods, based on a polyclonal non-absorbed antiserum containing f,g,s agglutinins and a pool of polyclonal absorbed antiserum, containing e,h; 1,6; i; 1,2, f,g,s and m,t agglutinins. The efficiency of the new assay was compared to that of the conventional method. The immunoassay was used for detection of *Salmonella* in baby-foods experimentally contaminated with different proportions of *Salmonella* and other enterobacteria. The sensitivity of the new assay was significantly higher than that of the conventional method. The agreement between the assay using the non-absorbed f,g,s antiserum and the conventional method was 89.6% and the sensitivity was 100.0%. When the pool of absorbed antiserum was used, the agreement between results was 81.3% and the sensitivity 100.0%. Results indicate that this immunoassay has a good potential to be used as an alternative method for screening *Salmonella* in foods.

**Keywords:** detection; *Salmonella*; enzyme immunoassay; foods.

## 1 - INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma enterobactéria que pode causar graves infecções gastrointestinais de origem alimentar, o que torna sua presença em alimentos um relevante problema de saúde pública. No Brasil, sua ocorrência tem sido observada em todos os tipos de alimentos, principalmente os de origem animal [5, 14, 23].

Em função dos riscos que a *Salmonella* representa para os consumidores, sua pesquisa em alimentos é de fundamental importância. Os produtores de alimentos, bem como os órgãos competentes de fiscalização, têm estado alertas para a necessidade de garantir a ausência de *Salmonella* nos alimentos. Entretanto, essa garantia pode se tornar extremamente onerosa, uma vez que as técnicas laboratoriais rotineiramente empregadas são extremamente trabalhosas e demoradas no fornecimento de resultados. Segundo o BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL [2], as técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* em alimentos geralmente

envolvem as seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação completa das colônias por meio de testes bioquímicos e sorológicos.

O grande número de etapas necessárias nas técnicas convencionais de análise e o longo tempo para obtenção de resultados são os principais motivos para o desenvolvimento de um número grande de novas técnicas para pesquisa de *Salmonella* em alimentos, tendo por objetivos principais a redução do tempo de análise, a simplificação do trabalho laboratorial e a redução do custo da análise. Muitas delas visam ainda uma vantagem adicional que é o aumento na precisão dos resultados [4].

Nos últimos anos, várias técnicas para detecção rápida de *Salmonella* foram propostas e dentre elas destacam-se as técnicas imunológicas, baseadas em reações antígeno-anticorpo. Entre essas técnicas, destacam-se as imunoenzimáticas que empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica [27]. As técnicas

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 09/03/01. Aceito para publicação em 28/11/01.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Mato Grosso - Faculdade de Enfermagem e Nutrição - Departamento de Ciência, Tecnologia de Alimentos e Nutrição Básica Av. Fernando Correia da Costa s/n - CEP 78068-900 - Cuiabá - MT - Brasil

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

<sup>4</sup> Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

cas imunoenzimáticas podem empregar anticorpos policlonais e também monoclonais [20, 21, 22].

A técnica imunoenzimática é totalmente dependente da especificidade da reação antígeno-anticorpo e tentativas anteriores de planejar métodos imunoenzimáticos específicos para *Salmonella* usando misturas de anticorpos policlonais produziram muitos resultados falso-positivos devido à presença de componentes comuns em enterobactérias que reagem de forma cruzada [19].

O desempenho de anticorpos policlonais para detecção de *Salmonella* em alimentos pela técnica imunoenzimática foi avaliado por FELDSINE, FALBO-NELSON, HUSTEAD [12, 13]. Esses autores demonstraram que o anti-soro policlonal foi capaz de detectar todos os sorotipos de *Salmonella* nas amostras de alimentos inoculadas experimentalmente, demonstrando a sua alta sensibilidade e especificidade para antígenos somáticos e flagelares de *Salmonella*.

Quanto aos anticorpos monoclonais, embora altamente específicos, apresentam o inconveniente de não reagirem com alguns dos sorotipos de *Salmonella*, levando a resultados falso negativos [8, 16, 18, 27, 28, 29].

Recentemente, REIS, MAMIZUKA, FRANCO [24] propuseram um esquema de produção de anticorpos policlonais de obtenção simples e barata, que foram empregados na padronização de uma técnica imunoenzimática, utilizando-se culturas puras de vários sorotipos de *Salmonella* e de outras enterobactérias. A técnica imunoenzimática proposta apresentou um alto potencial de utilização para pesquisa de *Salmonella* em alimentos. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar essa técnica imunoenzimática quanto à sensibilidade em relação ao método convencional de pesquisa de *Salmonella* em alimentos e também estudar a viabilidade de sua utilização para detecção de *Salmonella* em alimentos artificialmente contaminados.

Para reduzir ao mínimo a interferência da microbiota naturalmente presente nos alimentos no desempenho do teste imunoenzimático, o trabalho foi conduzido com alimentos infantis industrializados ("baby foods").

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Contaminação experimental das amostras de alimento

As cepas de *Salmonella* e de enterobactérias utilizadas na contaminação experimental das amostras de alimentos, adquiridas na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, no Laboratório Fleury (LF), São Paulo e na Faculdade de Medicina Veterinária - USP (FMVZ-USP) foram: *S. anatum* (IAL, sem código), *S. typhimurium* (IAL, sem código), *S. agona* (IAL 642), *S. montevideo* (IAL 359/94), *S. dublin* (LF), *S. derby* (LF), *S. madelia* (LF), *S. havana* (IAL 416/94), *S. newport* (IAL 459/94) e *S. gallinarum* (FMVZ-USP), *Citrobacter freundii* (IAL ATCC 8090), *Enterobacter aerogenes* (IAL ATCC 4280), *Escherichia coli* (IAL 1872),

*Providencia alcalifaciens* (IAL 9886 7/86), *Proteus mirabilis* (IAL 1022) e *Serratia liquefaciens* (IAL 1488 CDC 2126 9/86). Para a obtenção das culturas de *S. typhimurium* e *S. anatum* nas duas fases separadamente, utilizou-se o meio de fase reversa, conforme recomendado por EWING [11].

Cada microrganismo foi inoculado em 5mL de caldo soja tripticase (TSB-Difco) e incubado a 37°C por um período que variou de 18 a 24 horas. Após esse período, as culturas foram submetidas à diluições decimais sucessivas em solução salina 0,85% estéril, semeando-se 0,1mL na superfície de placas contendo ágar tripticase soja, com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). De acordo com as contagens obtidas, as culturas de *Salmonella* em caldo tripticase soja que haviam sido mantidas a 4°C foram diluídas em solução salina 0,85% estéril de forma a se obter soluções contendo 1UFC/mL, 10UFC/mL, 10<sup>2</sup>UFC/mL e 10<sup>3</sup>UFC/mL. Após as contagens emUFC/mL das enterobactérias individuais não pertencentes ao gênero *Salmonella*, preparou-se um "pool" contendo 10<sup>4</sup>UFC/mL.

Nos testes de contaminação experimental, foram empregadas 156 amostras de alimento infantil industrializado ("baby-food"), composto por: carne, cenoura, batata e mandioquinha, coletadas em supermercados da cidade de São Paulo. Esse número de amostras foi calculado em função do número de sorotipos de *Salmonella* (12) a serem testados, além do "pool" das enterobactérias, em quatro concentrações diferentes, utilizando-se as metodologias tradicional de cultivo e imunoenzimática, em triplicata.

O procedimento de contaminação experimental foi o seguinte: 25g de cada amostra foram transferidas para um saco plástico esterilizado, adicionando-se 1mL de uma das 12 culturas de *Salmonella* sp. e 1mL do pool de enterobactérias, para obtenção das combinações descritas na Tabela 1. Cada experimento foi repetido três vezes.

**TABELA 1.** Esquema da contaminação experimental das amostras de alimento infantil

Experimento nº	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/mL)	"Pool" de enterobactérias (UFC/mL)
1	1	10 <sup>4</sup>
2	10	10 <sup>4</sup>
3	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
4	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
controle negativo	-	10 <sup>4</sup>

### 2.2 - Pesquisa de *Salmonella* nas amostras inoculadas artificialmente pelo método convencional de cultura

A uma porção de 25g do alimento artificialmente contaminado adicionou-se 225mL de água peptonada tamponada (APT), segundo ICMSF [17] e incubou-se a 37°C por 18 a 24 horas. Aliquotas de 1,0mL e de 0,1mL do caldo de pré-enriquecimento foram transferidas para caldos tetracionato (TT - Difco) e Rappaport-Vassiliadis

(RV formulado), respectivamente. A formulação do caldo RV foi feita de acordo com o BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL [2]. Esses caldos foram incubados a 42°C em banho-maria por 6 horas, correspondendo à etapa de enriquecimento seletivo [9].

Com uma alça de níquel-cromo, cada meio de enriquecimento seletivo foi semeado em um tubo contendo caldo M (Difco) adicionado de 10µg/mL de novobiocina (Sigma). Estes caldos foram incubados a 42°C em banho-maria por 6 horas, correspondendo à etapa de pós-enriquecimento [9].

A partir de cada caldo de enriquecimento seletivo (TT e RV) e de pós-enriquecimento (M/TT e M/RV), semeou-se placas contendo água Hektoen Enteric (HE – Oxoid) e ágar Rambach (RAM – Merck) e incubou-se a 37°C durante 18 a 24 horas.

Duas a três colônias típicas de *Salmonella* nos meios HE e RAM foram transferidas para tubos contendo ágar TSI (tríplice açúcar e ferro – Oxoid) e ágar LI (lisina e ferro – Oxoid) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Colônias que apresentaram comportamento bioquímico característico de *Salmonella* foram submetidas a testes sorológicos de confirmação, utilizando-se soro polivalente somático (Probac do Brasil – Produtos Bacteriológicos Ltda.), pelo teste de aglutinação em lâmina [2].

Cabe ressaltar que, embora na pesquisa de *Salmonella* pelo método de cultura convencional não sejam adotadas as etapas de pós-enriquecimento em caldo M acrescido de novobiocina com posterior semeadura em meios seletivos diferenciais, essas etapas foram também realizadas para que fosse possível uma comparação adequada entre o teste imunoenzimático e o método de cultivo.

### 2.3 – Detecção de *Salmonella* pelo teste imunoenzimático

No teste imunoenzimático foi empregado o anti-soro f,g,s não absorvido e o anti-soro polivalente absorvido (“pool”) com antígenos heterólogos, constituído de mistura de soros monovalentes contendo as aglutininas e,h; 1,6; i; 1,2; fgs e m,t.

Para detecção de *Salmonella* pelo teste imunoenzimático seguiu-se a metodologia de CLARK e ENGVALL [6], ou seja: trabalhando-se com microplacas de titulação de poliestireno (Costar, EUA) transferiu-se para cada uma das cavidades 100µl da cultura nos caldos de enriquecimento TT, RV, M/TT e M/RV de cada uma das diferentes combinações entre *Salmonella* sp. e “pool” de enterobactérias, como também o “pool” de enterobactérias somente, conforme descrito na Tabela 1. Os testes foram realizados em duplicata (duas cavidades por cultura). As microplacas foram incubadas a 4°C em recipiente fechado, contendo algodão umedecido para evitar a desidratação dos reagentes (câmara úmida), durante 18 a 24 horas. Em seguida, as cavidades foram lavadas três vezes com PBS-T 0,01M, pH 7,2 (PBS adicionado de Tween 20 a 0,05%) e três vezes com água destilada,

utilizando uma lavadora automática de microplacas (Pasteur) e posteriormente bloqueadas com solução de leite desnatado (Molico) a 5% diluído em PBS-T. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após nova série de lavagens, adicionou-se a cada uma das cavidades de cada duplicata 100µl do anti-soro f,g,s não absorvido diluído a 1:2.500 em PBS-T. À outra cavidade de cada duplicata, adicionou-se 100µl do “pool” de anti-soros absorvidos que foram preparados conforme descritos por REIS, MAMIZUKA, FRANCO [24]. Seguiu-se então nova incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Após lavagens das cavidades como descrito anteriormente, adicionou-se 100µl do conjugado enzimático (anti-IgG-peroxidase, Sigma Chemical Co, EUA) diluído a 1:3000 e a 1:1000 em PBS-T, para reação com o anti-soro f,g,s não absorvido e o “pool” de anti-soros, respectivamente. Procedeu-se em seguida à incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Após novas lavagens, adicionou-se a cada cavidade 100µl da mistura cromógena de OPD (Sigma) na concentração de 0,4mg/mL em tampão fosfato-citrato, pH 5,0 e 40µl de peróxido de hidrogênio 30%, deixando-se à temperatura ambiente por 30 minutos para desenvolvimento de cor. A reação foi bloqueada pela adição de 50µl de ácido clorídrico 3N, a cada uma das cavidades. A determinação da densidade óptica (DO) em cada cavidade foi realizada em espectrofotômetro leitor de microplacas (Spectra, EUA) em comprimento de onda de 492nm.

### 2.4 – Análise estatística

Os resultados de positividade para *Salmonella* obtidos pelo teste imunoenzimático foram comparados aos obtidos pelo método de cultivo tradicional empregando-se o teste de Qui-quadrado de Mc Nemar, com 5% de significância [3]. Os índices avaliadores do teste (sensibilidade e concordância) foram calculados segundo GALEN e GAMBINO [15].

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do teste imunoenzimático em alimentos artificialmente contaminados com *Salmonella*, observou-se que todos os sorotipos de *Salmonella* inoculados nas amostras de alimentos foram detectados tanto no teste empregando anti-soro f,g,s não absorvido quanto naquele em que foi utilizado o “pool” de anti-soros absorvidos. Verificou-se que a eficiência do teste imunoenzimático depende da etapa do enriquecimento em que é realizado. Assim, quando o teste foi realizado com os caldos de enriquecimento seletivo TT ou RV, houve muitos resultados falso-positivos em amostras contendo apenas o “pool” de enterobactérias empregando o anti-soro f,g,s como o “pool” de anti-soros absorvidos.

A etapa de pós-enriquecimento, feito no caldo M, teve um papel fundamental para a detecção de *Salmonella* pelo teste imunoenzimático. Todos os testes realizados no caldo M referente aos alimentos inoculados

somente com a mistura de enterobactérias foram negativos para *Salmonella*, enquanto que nos alimentos inoculados com *Salmonella* e outras enterobactérias com exceção do sorotipo *S. typhimurium* (nas duas fases), os testes foram sempre positivos, mesmo nas amostras contendo apenas 10UFC/mL de *Salmonella*.

Deve-se ressaltar que a inclusão da etapa do pós-enriquecimento em caldo M é recomendada em técnicas imunoenzimáticas devido a sua reconhecida capacidade de estimular a formação de flagelos pelas cepas de *Salmonella* [9]. Além desse efeito, a novobiocina no caldo M, bem como a incubação desse caldo em temperatura elevada, tem inibido o crescimento de interferentes como *Proteus* sp. [9]. Nesse estudo nas 12 amostras inoculadas somente com a mistura de enterobactérias, os resultados do teste imunoenzimático realizado com o caldo M sempre foram negativos. Esses resultados são concordantes com os encontrados por ECKNER *et al.* [9], que utilizaram o mesmo procedimento com o caldo M e não encontraram nenhum resultado falso-positivo ao testar 1200 amostras de alimentos artificialmente contaminadas com *Salmonella*.

A eficiência de anticorpos policlonais para detecção de diferentes sorotipos de *Salmonella* nos alimentos foi também demonstrada por FELDSINE, FALBO-NELSON, HUSTEAD [12, 13], onde foi verificado que todos os sorotipos de *Salmonella* que haviam sido inoculados nas amostras de alimentos foram detectados pelos anticorpos preparados por esses pesquisadores.

Quanto aos resultados obtidos pelo método de cultivo, verificou-se que vários resultados foram falso-negativos e ocorreram predominantemente quando a quantidade de *Salmonella* inoculadas era baixa (1 ou 10UFC/mL). Esses resultados indicam que o método de cultivo tradicional não é eficiente para detectar baixos níveis de *Salmonella* em alimentos contendo uma significativa microbiota acompanhante. Utilizando o método de cultivo tradicional, na grande maioria dos casos os resultados foram negativos quando a quantidade de *Salmonella* inoculada era 1UFC/mL mesmo nos caldo M/TT e M/RV

Quando a proporção entre *Salmonella* e o “pool” de enterobactérias era 1:10<sup>4</sup>, a concordância entre os resultados obtidos pelo método de cultivo tradicional e o método imunoenzimático empregando os dois tipos de anti-soros, um monovalente não absorvido, específico para o antígeno flagelar f,g,s e o outro polivalente, absorvido com antígenos heterólogos, foi apenas 33,3% e 25,9%, respectivamente. Quando a concentração de *Salmonella* em relação às demais enterobactérias foi mais alta (10:10<sup>4</sup>, 10<sup>2</sup>:10<sup>4</sup> e 10<sup>3</sup>:10<sup>4</sup>) ocorreu uma total concordância entre os resultados obtidos.

Quanto à sensibilidade, tanto o anti-soro f,g,s não absorvido quanto o anti-soro polivalente absorvido apresentaram 100% de sensibilidade, detectando a presença de *Salmonella* em todas as proporções testadas (Tabelas 2 e 3).

Empregando-se o anti-soro f,g,s não absorvido (Tabela 4) obteve-se 100% de positividade no teste imuno-

enzimático realizado com os caldos TT e RV. Essa positividade caiu para 94,4% e 96,9% quando o teste foi realizado com os caldo M/TT e M/RV, respectivamente. Já nos testes empregando o “pool” de anti-soros absorvidos (Tabela 5), observou-se que os testes realizados com os caldos TT e RV deram 100% de positividade, enquanto aqueles realizados com os caldo M/TT e M/RV resultaram em 97,1% e 96,9% de positividade.

Os resultados obtidos pelos métodos imunoenzimático e cultivo diferiram significativamente ( $\alpha < 5\%$ ), quando o teste imunoenzimático foi realizado com o anti-soro polivalente. O resultado do teste imunoenzimático realizado no caldo TT foi positivo para todas as amostras contaminadas artificialmente. Já no teste realizado no caldo de enriquecimento RV, nem todas as amostras contaminadas artificialmente deram resultado positivo.

**TABELA 2.** Avaliação do desempenho do anti-soro f,g,s não absorvido na detecção de *Salmonella* em amostras de alimento infantil experimentalmente contaminadas em função da proporção do inóculo

Proporção <i>Salmonella</i> : enterobactérias (UFC/mL)	Nº de amostras analizadas	Resultados dos testes				X <sup>2</sup>	C (%)	S (%)
		E·M+	E·M-	E·M+	E·M-			
1:10 <sup>4</sup>	36	12	24	0	0	22	33,3	100
10:10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
10 <sup>2</sup> :10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
10 <sup>3</sup> :10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
Total	144	120	24	0	0			

**TABELA 3.** Avaliação do desempenho do “pool” de anti-soro absorvido na detecção de *Salmonella* em amostras de alimento infantil experimentalmente contaminadas em função da proporção do inóculo

Proporção <i>Salmonella</i> : enterobactérias (UFC/mL)	Nº de amostras analizadas	Resultados dos testes				X <sup>2</sup>	C (%)	S (%)
		E·M+	E·M-	E·M+	E·M-			
10 <sup>4</sup>	36	9	27	0	0	25	25	100
10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
10 <sup>4</sup>	36	36	0	0	0	0	100	100
Total	144	117	27	0	0			

+ = positivo; - = negativo; E = método imunoenzimático; M = método de cultivo tradicional; X<sup>2</sup> > 3,841; os métodos são significativamente diferentes a nível de 5%; C = percentual de concordância entre os dois métodos; S = sensibilidade do anti-soro utilizado

**TABELA 4.** Avaliação do desempenho do anti-soro f,g,s não absorvido na detecção de *Salmonella* em amostras de alimento infantil experimentalmente contaminadas em função das etapas de enriquecimento

Proporção <i>Salmonella</i> : enterobactérias (UFC/mL)	Nº de amostras analizadas	Resultados dos testes				X <sup>2</sup>	C (%)	S (%)
		E·M+	E·M-	E·M+	E·M-			
TT	144	117	27	0	0	25	81,3	100
RV	144	115	29	0	0	27	79,9	100
M/TT	144	102	9	6	27	0,3	89,6	94,4
M/RV	144	96	15	3	30	6,7	87,5	96,9

**TABELA 5.** Avaliação do desempenho do “pool” de anti-soros absorvidos na detecção de *Salmonella* em amostras de alimento infantil experimentalmente contaminadas em função da etapa de enriquecimento

Proporção <i>Salmonella</i> : enterobactérias (UFC/mL)	Nº de amostras analisadas	Resultados dos testes				X <sup>2</sup>	C (%)	S (%)
		E·M+	E·M-	E·M+ E·M-	E·M-			
TT	144	117	27	0	0	25	81,3	100
RV	144	114	27	0	0	25	81,3	100
M/TT	144	102	36	3	3	26,3	72,9	97,1
M/RV	144	96	36	3	6	29,2	70,8	96,9

+ = positivo; - = negativo; E = método imunoenzimático; M = método de cultivo tradicional; X<sup>2</sup> > 3,841; os métodos são significativamente diferentes a nível de 5%; C = percentual de concordância entre os dois métodos; S = sensibilidade do anti-soro utilizado

ROBISON, PRETZMAN, MATTINGLY [25], quando empregaram anticorpos monoclonais (MOPC 467) em um teste imunoenzimático indireto para a detecção de *Salmonella* em alimentos artificialmente contaminados, verificaram que todos foram positivos pelo teste imunoenzimático a partir do caldo M inoculado do caldo TT. ANDERSON e HARTMAN [1], trabalhando com um anti-soro comercial em um teste imunoenzimático indireto para a detecção de *Salmonella* em alimentos e ração naturalmente contaminados, revelaram que 18% deles foram positivos pelo teste imunoenzimático em caldo M também inoculado de caldo TT.

EMSWILER-ROSE *et al.* [10] encontraram uma concordância de 100% entre o teste imunoenzimático de duplo anticorpo comercial “*Salmonella* Bio-Enzabeed” e o método de cultivo, quando alíquotas do caldo de pré-enriquecimento (caldo lactosado) e do caldo de enriquecimento seletivo (tetracionato) foram analisadas.

FELDSINE, FALBO-NELSON, HUSTEAD [12] verificaram uma concordância de 97,2% entre o teste imunoenzimático tipo sanduíche, contendo anticorpos policlonais somáticos e flagelares, e o método de cultivo, enquanto em outro estudo empregando os mesmos anticorpos e tipo de teste imunoenzimático, esses mesmos autores [13] encontraram entre os dois métodos uma concordância de 95,6%.

ECKNER *et al.* [9] encontraram concordância de 96,7% entre o método de cultivo e o teste imunoenzimático comercial “*Salmonella*-Tek”, enquanto CURIALE *et al.* [7] encontraram concordância de 99,1% entre os dois métodos quando testaram amostras de alimentos naturalmente e artificialmente contaminadas.

SANTOS e ALEIXO [26] verificaram que na análise de alimentos artificialmente contaminados, o teste imunoenzimático indireto empregando soro policlonal somático anti-*Salmonella* foi capaz de detectar *Salmonella* em níveis de contaminação entre 1 e 100UFC/25g de carne e na comparação entre as metodologias imunoenzimática e convencional revelou sensibilidade de 91% e concordância de 69%.

#### 4 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o bom desempenho do teste imunoenzimático, ao

empregar o anti-soro policlonal monovalente f.g,s não absorvido ou o anti-soro polivalente absorvido, indica um grande potencial de aplicação na triagem de *Salmonella* em alimentos, devido à alta sensibilidade do teste e o curto período de tempo requerido para a sua realização, além da possibilidade de automação para análise de grande número de amostras.

#### 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, J.M.; HARTMAN, P. A. Direct immunoassay for detection of *Salmonellae* in foods and feeds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, n. 5, p. 1124-1127, 1985.
- [2] BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL - United States Food and Drug Administration and Association of Official Analytical Chemists International. 7. th. Arlington. 1992. 529p.
- [3] BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980. 324p.
- [4] BLACKBURN, C. de W. Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonellas* in foods. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 199-214, 1993.
- [5] BONILHA, P.R.M.; FALCÃO, D.P. Ocorrência de enteropatógenos em alfices e suas águas de irrigação. **Alim. Nut.**, v. 5, p. 87-97, 1993/1994.
- [6] CLARK, B.R.; ENGVALL, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In: MAGGIO, E.T. **Enzyme Immunoassay**, Florida: CRC Press, 1981. 295p. p.167-180.
- [7] CURIALE, M. S.; KLATT, M. J.; ROBISON, B.J.; BECK, L.T. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening methods for detection of *Salmonella* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, n. 1, p. 43-50, 1990.
- [8] D'AOUST, J.-Y; SEWELL, A. M. Detection of *Salmonella* by the enzyme immunoassay (EIA) technique. **J. Food Sci.**, v. 51, n. 2, p. 484-488, 1986.
- [9] ECKNER, K.F.; MCIVER, R.; LEPPER, W.A.; FANNING, L.; CURIALE, M.S.; FLOWERS, R.S.; ROBISON, B. Use of an elevated temperature and novobiocin in a modified enzyme-linked immunosorbent assay of the improved recovery of *Salmonella* from foods. **J. Food Prot.**, v. 55, n. 10, p. 758-762, 1992.
- [10] EMSWILER-ROSE, B.; GEHLE, W.D.; JOHNSTON, R.W.; OKREND, A.; MORAN, A.; BENNETT, B. An enzyme immunoassay technique for detection of *Salmonellae* in meat and poultry products. **J. Food Sci.**, v. 49, n. 4, p. 1018-1020, 1984.
- [11] EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 4.th. New York: Elsevier Science Publishing, 1986. 563p.
- [12] FELDSINE, P.T.; FALBO-NELSON, M.T.; HUSTEAD, D.L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: Collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 75, n. 6, p. 1032-1044, 1992.
- [13] FELDSINE, P.T.; FALBO-NELSON, M.T.; HUSTEAD, D.L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: Collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 76, n. 3, p. 694-697, 1993.
- [14] FUZIHARA, T.O.; FRANCO, B.D.G.M. Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André-S.P. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 13, n. 1, p. 77-88, 1993.

- [15] GALEN, R.S.; GAMBINO, S.R. **Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis.** New York: John Wiley & Sons, 1975. 237p.
- [16] IBRAHIM, G.F.; FLEET, G.H.; LYONS, M.J.; WALKER, R.A. Immunological relationships between *Salmonella* flagella and their potential application for salmonellae detection by immunoassay. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 174, n. 2, p. 87-99, 1985.
- [17] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico.** 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1982. 431p.
- [18] JARADAT, Z.W.; ZAWISTOWSKI, J. Production and characterization of monoclonal antibodies against the O-5 antigen of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 1, p. 1-5, 1996.
- [19] KRYSINSKI, E.P.; HEIMSHC, R.C. Use of enzyme-labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 947-954, 1977.
- [20] LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov., nom. ver., as the type and only species of the Genus *Salmonella*. **Inst. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 37, n. 4, p. 465-468, 1987.
- [21] MATTINGLY, J.A. An enzyme immunoassay for the detection of all *Salmonella* using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody. **J. Immunol. Meth.**, v. 73, p. 147-150, 1984.
- [22] MORGAN, M.; LEE, H. **Immunological methods for food analysis - training course.** Campinas, São Paulo: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 1990. "não paginado".
- [23] REIS, R.B.; KRUGER, C.S.; MACIEL, M.S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.
- [24] REIS, R.B.; MAMIZUKA, E.M.; FRANCO, B.D.G.M. Produção de imunoreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Alim.** (no prelo).
- [25] ROBISON, B.J.; PRETZMAN, C.I.; MATTINGLY, J.A. Enzyme immunoassay in which a myeloma protein is used for detection of *Salmonellae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1816-1821, 1983.
- [26] SANTOS, A.; ALEIXO, J.A.G. Um ELISA indireto para detecção de salmonelas em alimentos. In: **XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Rio de Janeiro, RJ, 11-15 de novembro de 1997.
- [27] SCHUURS, A.H.W.M.; VAN WEEMEN, B.K. Enzyme-immunoassay. **Clin. Chem.**, New York, v. 81, n. 1, p. 1-40, 1977.
- [28] TSANG, R.S.W.; NIELSEN, K.H.; JOHNSON, W.M. Development of an indirect whole cell ELISA for the rapid identification of *Salmonella*. **J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.**, v. 4, p. 139-154, 1995.
- [29] ZIJDERVELD, F.G.; BEMMEL, A.M.; ANAKOTTA, J. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. **J. Clin. Microbiol.**, n. 30, n. 10, p. 2560-2566, 1992.

## 6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos pela doação dos animais usados nesse estudo, bem como pelo empréstimo do seu biotério para a imunização dos animais.