

DETECÇÃO RÁPIDA DE *Salmonella* ENTERITIDIS EM ALIMENTOS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA¹

Iliana ALCOCER², Tereza Cristina R. M. de OLIVEIRA^{2,*}

RESUMO

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp., além de trabalhoso, consome longo tempo, necessitando-se normalmente de 4 a 5 dias para a confirmação da presença dessa bactéria no alimento. Portanto, o emprego de métodos rápidos e simples é importante para o diagnóstico laboratorial de toxinfecção alimentar e para o controle de qualidade. O objetivo principal deste trabalho foi a padronização de ensaio imunoenzimático-ELISA para detecção de *Salmonella* Enteritidis em alimentos. O ensaio utilizou anticorpos policlonais para flagelina produzidos em coelho. O anti-soro apresentou pouca reação cruzada com os sorotipos de *Salmonella* e as diferentes espécies de enterobactérias testadas. A sensibilidade do ensaio foi de 10⁴ células/mL, quando testado em cultivo puro. O conjugado peroxidase manteve-se estável durante dois meses a 4°C e o seu uso deve ser exclusivamente durante este tempo. O ensaio padronizado apresentou simplicidade e rapidez, com sensibilidade de 1 célula/25g de maionese de batata e cenoura, após enriquecimento em água peptonada tamponada durante 24 horas a 37°C, sem necessidade de enriquecimento seletivo.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis; ELISA; detecção rápida.

SUMMARY

RAPID DETECTION OF SALMONELLA ENTERITIDIS IN FOOD BY ELISA ASSAY. Traditional cultural methods for the detection of *Salmonella* in foods is a labour-intensive and time-consuming, taking 4 to 5 days for the final results to be known. Therefore, simplified and rapid methods are required for both diagnosis of foodborne diseases and microbiological food quality control. The aim of this study was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods. The assay used a polyclonal detector antibody to flagelin raised in rabbit. The anti-sera obtained showed slight cross-reactions to others *Salmonella* serotypes and Enterobacteriaceae species tested. The method sensitivity was of 10⁴ cells/mL of pure culture. The horseradish peroxidase conjugate was stable up to two months at 4°C and for this reason it should be used only during this period. The method also showed sensitivity of 1 cell per 25g of potato and carrot salad containing home-made mayonnaise by using only a cultural stage in buffered peptone water incubated for 24 hours at 37°C. In conclusion, the method showed to be practical and reliable to detect *Salmonella* Enteritidis in foods.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; ELISA; rapid detection.

1 – INTRODUÇÃO

A salmonelose humana ocorre, principalmente, devido ao consumo de alimentos e água contaminados com *Salmonella* spp. Vários alimentos já foram associados a esta infecção. Entretanto, nos últimos anos observou-se em todo o mundo, um aumento de salmonelose humana devido ao sorotipo Enteritidis, relacionado com o consumo de frango, ovos e derivados [10, 11].

O método convencional de detecção de *Salmonella* em alimentos envolve etapas de cultura dispendiosas e trabalhosas, consome longo tempo, necessitando-se normalmente de 4 a 5 dias para a confirmação dos resultados [4, 6]. Portanto, o emprego de métodos rápidos, simples e confiáveis, é importante tanto no diagnóstico de toxinfecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos.

Diversas técnicas imunológicas já foram desenvolvidas, usando tanto anticorpos monoclonais como policlonais os quais detectam a maioria dos sorotipos de *Salmonella* associados à infecção humana [12, 18, 21, 25, 33, 40]. Estes ensaios estão disponíveis comercial-

mente na forma de kits [3], geralmente de custo inacessível para a maioria dos laboratórios brasileiros, principalmente para aqueles públicos e oficiais de diagnóstico de toxinfecção alimentar.

O objetivo deste trabalho foi a produção de reagentes imunológicos para a detecção direta de *Salmonella* Enteritidis em alimentos, empregando-os na padronização de um ensaio imunoenzimático – ELISA sanduíche.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Produção e purificação do anti-soro

O anti-soro policlonal para *Salmonella* Enteritidis foi obtido no Laboratório de Ciência de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (TAM), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. O anti-soro foi produzido em coelho branco Nova Zelândia utilizando-se flagelina purificada gentilmente doada pelo Dr. Gary Wyatt do “Institute of Food Research”, Norwich, Inglaterra. Na primeira dose foram inoculadas 100µg de flagelina e após 9 dias foi injetada a mesma quantidade de antígeno. Após 70 dias, foi inoculada uma dose de reforço com 300µg de flagelina. As doses de flagelina foram administradas por injeção subcutânea, distribuídas em três diferentes locais na região dorsal do animal. O adjuvante de Freund completo foi empregado na primeira dose e o incompleto na segunda e terceira doses.

¹ Recebido para publicação em 21/05/2002. Aceito para publicação em 25/02/2003 (000828).

² Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Campus Universitário, C.P. 6001, CEP.87051-970, Londrina, PR, Brasil, e-mail: tereza@uel.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

O anti-soro imune foi obtido por sangria da veia marginal da orelha ou por punção cardíaca. Após uma semana da terceira dose, oito coletas foram realizadas semanalmente durante dois meses.

O anti-soro foi purificado por cromatografia de afinidade com Sepharose Proteína A (Pharmacia) de acordo com ALCOCER [1]. Aliquotas de 10mL do anti-soro foram colocadas na coluna que foi lavada três vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M pH 7,4. A fração contendo IgG anti-flagelina foi eluída a 4°C com tampão citrato de sódio 0,05M pH 2,8, corrigindo-se imediatamente o pH do eluído com tampão TRIS 1M pH 8,8. As frações lidas a 280nm, contendo as maiores concentrações protéicas, foram misturadas e dialisadas em PBS, sendo o teor de proteína determinado pelo método de LOWRY *et al.* [30]. O anti-soro purificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme o descrito por ITANO [27].

2.2 – Preparação da suspensão de *Salmonella Enteritidis*

Suspensões bacterianas de *Salmonella Enteritidis* (doação da Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil), foram preparadas de acordo com o preconizado por WYATT *et al.* [38], com algumas modificações [1]. Para uso no imunoenensaio, as células bacterianas foram cultivadas em BHI e mortas pelo calor empregando-se banho-maria a 72°C durante 15 minutos. Após este tratamento térmico, as células foram centrifugadas a 650 x g por 15 minutos, lavadas três vezes com salina estéril (NaCl 8,5g/L) e suspendidas novamente em salina para ajustar a absorbância de 0,6 a 650nm.

2.3 – Avaliação da especificidade do anti-soro produzido

Para a avaliação das reações cruzadas, empregou-se a metodologia descrita por LEE *et al.* [29], com modificações de ALCOCER [1]. Utilizaram-se suspensões de *Salmonella Enteritidis* (doação da Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil), *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Typhimurium (sorotipos obtidos no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis* (doados pelo Prof. Francisco Herrero, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil).

Neste ensaio foram usadas microplacas de poliestireno (NUNC-PolySorp) revestidas com 100mL das suspensões bacterianas. O soro policlonal anti-flagelina foi diluído a 1:100; 1:1000; 1:10.000; 1: 100.000 e 1:1.000.000 em tampão fosfato de sódio 0,15M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0,05%). Anti-IgG de coelho ligado à fosfatase (SIGMA Immuno Chemical A – 3687) diluído a 1:1000 em PBST 0,05% foi empregado como conjugado e p-nitrofenil fosfato (SIGMA 104-105) como substrato. A absorbância foi lida a 405nm em espectrofotômetro leitor de microplacas Emax S/N E9637.

Como recomendado por LEE *et al.* [29], para o cálculo da porcentagem de reação cruzada com cada microorganismo testado foi utilizada a diluição do anticorpo

correspondente à metade da absorbância obtida com a suspensão de *Salmonella Enteritidis*. Esse valor foi dividido pela diluição do anticorpo obtido com cada uma das suspensões de enterobactérias e dos outros sorotipos de *Salmonella* testados. Os testes foram realizados três vezes em triplicata Curvas de regressão linear realizadas no programa MicroCal Origen 3.01 da MicroCal Software foram empregadas no cálculo das porcentagens de reação cruzada e exemplificada a seguir para *Salmonella* Typhimurium:

Fórmula das curvas de regressão linear $Y = a + bx$

$$\text{Salmonella Enteritidis} \quad Y = 0,26382 + 1754,93205x_1$$

$$\text{Salmonella Typhimurium} \quad Y = 0,10884 + 339,90192x_2$$

$Y = 1,0095$ (metade da absorbância máxima de 2,019 para *Salmonella Enteritidis*)

$$\% \text{ de reação cruzada} = x_1/x_2 \times 100$$

16,03% de reação cruzada de *Salmonella* Typhimurium

2.4 – Preparo do conjugado anti-flagelina peroxidase

O conjugado anti-flagelina peroxidase foi preparado segundo a técnica proposta por WILSON, NAKANE [36], com modificações [37]. Foram dissolvidas 4mg de peroxidase (SIGMA Immuno Chemical A – 0545) em 1mL de água destilada e imediatamente adicionados 0,2mL de periodato de sódio (NaIO₄) 0,1M recém-preparado. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 20 minutos e dialisada “overnight” com 500mL de tampão acetato 1mM pH 4,4 a 4°C.

Após a diálise, o pH foi ajustado para 9,0 a 9,5 com 20μL de tampão carbonato de sódio 0,2M pH 9,5. Imediatamente foram adicionados 8mg de IgG anti-flagelina, purificada conforme item 2.1, dissolvida em 1mL de tampão carbonato de sódio 0,01M pH 9,5. Após agitação da mistura reativa por duas horas em temperatura ambiente, foi adicionado 0,1mL de boridrato de sódio (NaBH₄) 4mg/mL recém-preparado. A mistura foi mantida a 4°C por duas horas, dialisada “overnight” com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M pH 7,4 a 4°C e clarificada por centrifugação. Para cada 1mg de conjugado foram adicionadas 10mg de soro albumina bovina por mililitro de água destilada. O conjugado preparado foi dividido em alíquotas de 0,1mL conservado a 4°C para uso e a -70°C para maior tempo de estocagem.

2.5 – Determinação do título do conjugado anti-flagelina peroxidase e padronização do ELISA

O título do conjugado foi determinado baseando-se no método preconizado por FEY, PFISTER & RUEGG [15], com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno NUNC MaxiSorp foram revestidas com 300µL de uma solução de IgG anti-flagelina purificada (item 2.1) e diluída em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6 (tampão de cobertura) na concentração de 10µg de IgG/mL. Após 18 horas de incubação a 4°C, as microplacas foram lavadas por três vezes com água purificada e adicionadas de 200µL de leite desnatado (Molico-NESTLE) 5% em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6. Após incubação por 1 hora a 37°C, as microplacas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween (PBST 0,05%) e mantidas a -20°C. Para o uso as microplacas foram colocadas na estufa a 35°C por 10 minutos. A seguir, 100µL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis com absorvância de 0,6, preparada conforme item 2.2, foram adicionados em cada orifício e as microplacas incubadas por 2 horas a 37°C. Após cinco lavagens com PBST 0,05%, foram adicionados, em triplicata, 100µL do conjugado anti-flagelina peroxidase, preparado conforme item 2.4, diluído a 1:500; 1:1000; 1:1500; 1:2000; 1:2500; e 1:3000 em PBST 0,05% e as microplacas incubadas a 37°C por uma hora. Após cinco lavagens com PBST 0,05%, foram adicionados 100µL de 3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina (TMB) (SIGMA T-8665). A reação enzimática foi interrompida após 10 minutos com 50µL de H₂SO₄ 2M e a absorvância lida a 450nm.

O título do conjugado peroxidase anti-flagelina foi a diluição cuja absorvância obtida a 450nm foi de 0,5 a 1,0, após 10 minutos de reação com o substrato.

Após a determinação do título do conjugado e com a finalidade de melhorar a eficiência do ensaio, o procedimento descrito acima foi repetido utilizando-se 20 minutos de reação com o substrato e volumes de 50 e 200µL da suspensão de *Salmonella* Enteritidis com absorvância 0,6. Ensaio foi realizado três vezes em triplicata.

2.6 – Tempo de validade do conjugado anti-flagelina peroxidase

Testes semanais, utilizando a metodologia descrita no item 2.5, foram realizados durante dois meses com o conjugado conservado a 4°C e diluído a 1:500.

2.7 – Avaliação da sensibilidade do ELISA padronizado

Para avaliar a sensibilidade do ELISA, foram preparadas suspensões de 10¹ a 10⁶ células de *Salmonella* Enteritidis por mililitro de PBST 0,05% estéril. As diluições foram feitas a partir de crescimento em BHI, incubado por 24 horas a 37°C. A confirmação do número de células foi realizada através da contagem de colônias no meio de Hektoen. As suspensões sofreram tratamento térmico prévio, conforme item 2.2, antes da execução do ELISA padronizado conforme item 2.5.

2.8 – Aplicação do ensaio imunoenzimático – ELISA padronizado em extrato alimentar

A emulsão para maionese caseira foi preparada em liquidificador com dois ovos inteiros e 10mL de suco de limão, que foi adicionada de 300 gramas de batatas co-

zidas e 150 gramas de cenouras cozidas e cortadas em cubos. O pH foi em torno de 4,5.

Vinte e cinco gramas desta maionese foram assepticamente pesados e contaminados com *Salmonella* Enteritidis cultivada em infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C por 24 horas. Foram inoculadas 1, 10, 100 e 1000 células por cada 25g de alimento, em duplicata com duas repetições em dias diferentes. A confirmação do inóculo adicionado foi realizada através de cultura da maionese contaminada em Hektoen. Uma amostra de maionese não contaminada foi empregada como controle negativo do ensaio.

Para o pré-enriquecimento, amostras contaminadas foram homogeneizadas em Stomacher (Seward Stomacher 400 Lab System) por 1 minuto com 225mL de água peptonada tamponada e incubadas a 37°C. Após 24 horas de incubação, foram transferidas alíquotas de 0,1mL para 9,9mL de Rappaport Vassiliadis (RV) e o enriquecimento seletivo realizado a 42°C por 24h.

Para a realização do ELISA, após o pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, as amostras de maionese foram centrifugadas a 650 x g por 30min, os sobrenadantes separados e aquecidos a 72°C por 15min.



FIGURA 1. Protocolo de padronização de ELISA

Microplacas de poliestireno (NUNC MaxiSorp) revestidas com anti-flagelina, conforme item 2.5, foram adicionadas de 50µL da suspensão de *Salmonella* Enteritidis com absorvância de 0,6 (utilizada como controle positivo), sobrenadante da maionese não contaminada (utilizada como controle negativo) e os sobrenadantes da maionese contaminada incubados a 37°C e 42°C por 8 e 24h em água peptonada tamponada

e RV, respectivamente. O restante do procedimento foi realizado conforme item 2.5 empregando-se 100µL do conjugado diluído a 1:500 e leitura de absorbância após 10 minutos de reação com o TMB (Figura 1).

Paralelamente, contagens de colônias em Hektoen foram realizadas a partir de alíquotas retiradas da água peptonada tamponada e RV, após 8 e 24 horas de incubação a 37°C e 42°C, respectivamente.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Especificidade do soro anti-flagelina para *Salmonella Enteritidis*

As curvas de regressão linear usadas no cálculo das reações cruzadas se encontram na Figura 2. O anti-soro apresentou pouca reação cruzada com os sorotipos Typhimurium, Infantis e Newport, sendo que as porcentagens foram de 16,0; 11,9 e 6,4%, respectivamente (Tabela 1). Essas porcentagens de reação cruzada foram, em geral, menores que aquelas encontradas por LEE *et al.* [29], que padronizaram ELISA sanduíche para detecção de *Salmonella* Typhimurium em alimentos empregando flagelina como antígeno. Esses autores obtiveram anti-soro com porcentagens de reação cruzada de 32% para *Salmonella* Hadar, de 30% para *Salmonella* Weltevreden, de 20% para *Salmonella* Agona e de 10% para *Salmonella* Enteritidis.

A flagelina tem sido reportada como um dos melhores antígenos para a produção de anti-soro tanto para triagem sorológica como para padronização de ensaios imunoenzimáticos de *salmonellas* móveis. Assim, IBRAHIM, LYONS [26] encontraram bons resultados quando padronizaram ensaios para a detecção de *Salmonella* em alimentos empregando flagelina.

Menor especificidade tem sido encontrada quando são produzidos anticorpos para lipopolissacarídeo (LPS) ou fimbrias. BAAY, HUIS & VELD [5] observaram reações cruzadas com vários sorotipos de *Salmonella* quando LPS foi empregado no preparo do anti-soro, o mesmo não ocorrendo com anti-soro preparado utilizando antígenos flagelares. Resultados semelhantes foram encontrados por HASSAN *et al.* [22] e TIMONEY *et al.* [35], que também empregaram antígenos flagelares.

Assim sendo, baseado nestes fatos e analisando os resultados obtidos neste trabalho pode-se sugerir a utilização da flagelina para a produção de anti-soro, principalmente, se os anticorpos forem policlonais. Por outro lado, REIS, MAMIZUKA & FRANCO [33] produziram anticorpos policlonais específicos empregando culturas formolizadas de *Salmonella* Typhimurium, Agona, Anatum e Oranienburg e encontraram que o soro monovalente não absorvido (contendo as aglutininas f, g, s) e o "pool" de antisoros absorvidos detectaram todos os sorotipos de *Salmonella* testados. O soro polivalente não absorvido revelou resultados falso-positivos com *C. freundii*, *P. alcalifaciens* e *P. mirabilis*, que foram eliminados com a absorção. Portanto, a absorção do anti-soro para *Salmonella* Enteritidis produzido neste traba-

lho poderia diminuir ou eliminar as reações cruzadas observadas (Tabela 1), principalmente, com outros sorotipos de *Salmonella*.

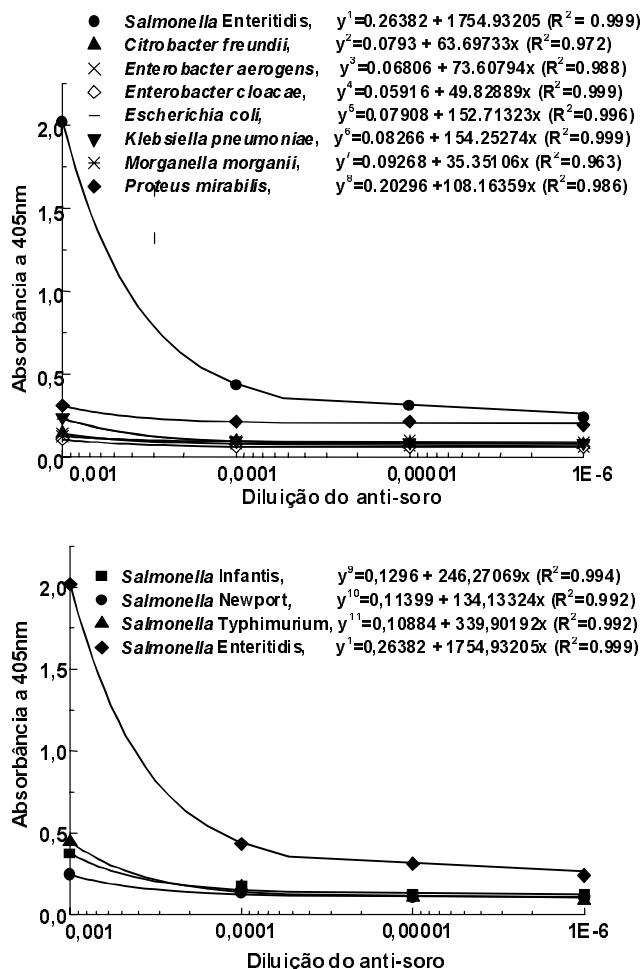


FIGURA 2. Curvas de diluição do soro anti-flagelina empregadas no cálculo das reações cruzadas

TABELA 1. Porcentagem de reação do anticorpo policlonal anti-flagelina com *Salmonella* Enteritidis e com outras enterobactérias

Enterobactérias	Porcentagem Reação
<i>Citrobacter freundii</i>	2,9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,2
<i>Escherichia coli</i>	7,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,1
<i>Morganella morganii</i>	1,6
<i>Proteus mirabilis</i>	5,7
<i>Salmonella</i> Infantis	11,9
<i>Salmonella</i> Newport	6,4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	16,0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	100,0

3.2 – Determinação do título e estabilidade do conjugado peroxidase

O título do conjugado peroxidase, após a análise da Figura 3, foi de 1:500 sendo a média de absorbância a 450nm de 0,874. Os valores de absorbância para os controles negativos variaram de 0,115 a 0,226 (Figura 3).

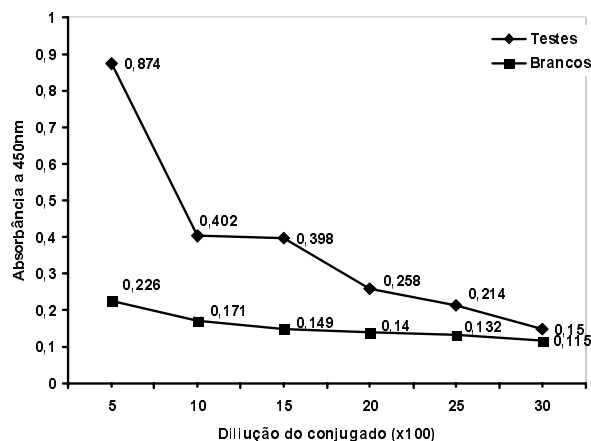


FIGURA 3. Título do conjugado anti-flagelina peroxidase para *Salmonella* Enteritidis determinado por ELISA sanduíche

O conjugado peroxidase, descongelado para o uso, foi conservado a 4°C e o estudo da estabilidade realizado através de análises semanais. No decorrer de dois meses houve perda gradativa de aproximadamente 0,1 na absorbância, prejudicando a sensibilidade do ensaio. Portanto, dois meses foi o tempo máximo de estabilidade do conjugado peroxidase, mantido a 4°C.

OLIVEIRA [32] observou que o conjugado anti-enterotoxina estafilocócica A peroxidase conservado a -70°C manteve a atividade inalterada por um ano. Porém, uma vez descongelado e mantido a 4°C o tempo de uso foi de dois meses, como o observado no presente trabalho. WILSON, NAKANE [36] chegaram a mesma conclusão sobre conjugado preparado com peroxidase conservado a -70°C, que manteve atividade de pelo menos 2 anos quando freqüentes congelamentos e descongelamentos foram evitados.

3.3 – Determinação da sensibilidade do método ELISA padronizado na detecção de *Salmonella* Enteritidis

Para a padronização do ELISA sanduíche foram testados dois tempos diferentes de reação com o substrato e três volumes diferentes de suspensão de *Salmonella* (item 2.5). Os melhores resultados foram obtidos com 50µL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis D.O. 0.6 a 650nm e 10 minutos de reação com o TMB.

A sensibilidade do ELISA foi de 10⁴ células/mL, igual à obtida por BRIGMON, ZAM & WILSON [9], que padronizaram um ensaio imunoenzimático empregando anticorpos monoclonais e policlonais. A mesma sensibilidade também foi encontrada por HOLT, GAST & GREENE [23] utilizando somente anticorpos monoclonais para flagelina de *Salmonella*.

REIS, MAMIZUKA & FRANCO, [33] encontraram sensibilidade de 10³ UFC/mL em cultura pura ao utilizarem anti-soros policlonais produzidos com culturas formolizadas de quatro sorotipos de *Salmonella*.

BRIGMON *et al.* [8] ao padronizarem um ELISA empregando anticorpo monoclonal de classe IgG específico para lipopolissacarídeos de *Salmonella* Enteritidis (ASCI) obtiveram sensibilidade de 10⁵ células/mL em cultivo puro.

A produção de anticorpos policlonais apresenta algumas limitações tais como, necessidade do fornecimento contínuo de antígeno purificado para as injeções, manutenção em laboratório de animais, variação do soro dependendo do tempo de imunização e da intensidade da resposta imune, variabilidade individual entre os animais ou mesmo no próprio animal de uma sangria para outra [19].

Apesar das desvantagens dos anticorpos policlonais, no presente trabalho foi padronizado um ensaio que permitiu a detecção de *Salmonella* Enteritidis com limite de detecção de 10⁴ células/mL de cultivo puro.

Anticorpos monoclonais oferecem várias vantagens, como uniformidade, especificidade, homogeneidade e afinidade para um simples epítipo [19]. Entretanto, melhores condições de infra-estrutura são necessárias para o trabalho com a tecnologia de hibridomas. Assim sendo, anticorpos monoclonais poderão ser produzidos no futuro, visando aumentar a especificidade e a sensibilidade do ensaio padronizado neste trabalho.

3.4 – Aplicação do ELISA padronizado em extratos alimentares

Amostras de maionese de batata e cenoura, contaminadas com 1, 10, 100 e 1000 células de *Salmonella* Enteritidis/25g foram analisadas pelo ELISA sanduíche padronizado (item 3.3). Com este ensaio foi possível detectar 1 célula de *Salmonella* Enteritidis em 25g de alimento, após enriquecimento em água peptonada alcalina por 24 horas a 37°C (Figura 4).

Na Figura 4 podemos observar que, após 8 e 24 horas de incubação em água peptonada, as absorbâncias foram proporcionais ao inóculo inicial, ou seja, quanto menor o inóculo menor a absorbância obtida. Após o enriquecimento seletivo em RV por 8 e 24 horas de incubação, todas as amostras contaminadas com *Salmonella* foram detectadas pelo ELISA padronizado.

A Legislação Brasileira exige para consumo humano a ausência de *Salmonella* em 25g de alimentos [7]. Portanto, o ensaio precisa detectar 1 célula em 25g de amostra. O método tradicional oferece essa sensibilidade após 24 horas de pré-enriquecimento e 24 horas de enriquecimento seletivo.

O ELISA desenvolvido neste trabalho apresentou sensibilidade de 10⁴ células/mL em cultivo puro. Quando o ensaio foi realizado com maionese de batata e cenoura, a sensibilidade foi de 10⁵ células/g, com inóculo inicial de 10 células e período de incubação de 8 horas em água peptonada. Quando a contaminação foi com 1 célula em

25g de maionese foi possível detectar *Salmonella* após 24 horas de incubação em água peptonada.

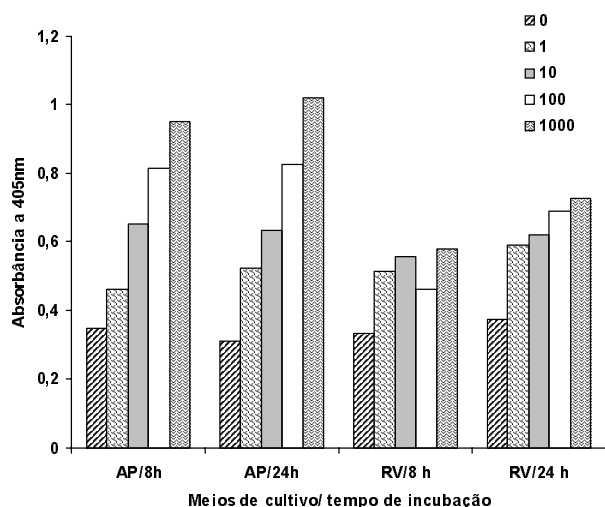


FIGURA 4. Avaliação da sensibilidade do ELISA em maionese contaminada com 1, 10, 100 e 1000 UFC de *Salmonella* Enteritidis/25g, após incubação por 8 e 24 horas em água peptonada tamponada (AP) e Rappaport-Vassiliadis (RV).

BRIGMON, ZAM & WILSON [9] comprovaram que a sensibilidade do ELISA, desenvolvido com anticorpos monoclonais e policlonais para detectar *Salmonella* em alimentos, pode variar dependendo do tipo de amostra. Esses autores analisaram carne de frango, pele de frango e ovo. *Salmonella* Enteritidis foi detectada em uma concentração de 10^4 células/mL em cultivo puro e na carne de frango. A sensibilidade decresceu para 10^5 e 10^7 quando pele de frango e ovos foram analisados, respectivamente. A possível explicação para essas diferenças pode ser a presença de interferentes do alimento como albumina no ovo e gordura na pele, que atuam como agentes bloqueadores, inibindo a ligação do anticorpo.

Portanto, o método padronizado neste trabalho precisa ser validado através da análise de outros alimentos com a finalidade de observar a interferência de outras matrizes alimentares.

É complexo analisar os diferentes ensaios imunoenzimáticos empregados na detecção de *Salmonella* não somente pelo tipo de alimento que afeta a performance do ensaio, como também, os variados protocolos de enriquecimento que são usados. Para a obtenção de sensibilidade equivalente ao método tradicional (1 célula/25g), os métodos imunoenzimáticos, necessitam de um, dois ou três passos prévios de incubação e vários autores indicam o uso de diferentes meios de pré-enriquecimento e de enriquecimento seletivo [3, 19, 24, 28, 39].

A maioria dos kits inclui três passos sucessivos de preparo da amostra antes da análise pelo ELISA [4]. Normalmente, o processo inicia com uma incubação de 18-24 horas em água peptonada tamponada, seguido de uma segunda incubação por 18-24 horas em meios de enriquecimento seletivo e pós-enriquecimento em cal-

do M por 6 horas [2, 4].

O caldo selenito cistina, caldo Rappaport Vassiliadis e/ou caldo tetracionato são os meios de enriquecimento seletivo mais utilizados. A eficácia do caldo Rappaport-Vassiliadis, do caldo tetracionato e do caldo selenito cistina para recuperar *Salmonella* spp. de alimentos, quando o número de células é pequeno, foi avaliada por HAMMACK *et al.* [20]. Esses autores concluíram que é recomendável usar tanto caldo tetracionato quanto Rappaport-Vassiliadis para recuperar *Salmonella* spp. de qualquer tipo de alimento.

MANTTINGY, GEHLE [31] usaram meio de pré-enriquecimento em tampão fosfato e pós-enriquecimento em caldo M para detectar 1 célula de *Salmonella* em 25g de alimento. IBRAHIM, LYONS [26] usaram 24 horas de pré-enriquecimento em água peptonada tamponada seguido de 18 – 24 horas de enriquecimento seletivo em caldo manitol selenito cistina, para obter a mesma sensibilidade do método tradicional. Esses autores não utilizaram pós-enriquecimento em caldo M porque este meio nem sempre oferece condições para o adequado crescimento de *Salmonella*, o que também foi observado por FLOWERS [17]. Devido a esta incerteza e com a finalidade de obter um ensaio mais rápido e econômico, no presente trabalho não foi utilizado o caldo M como meio de pós-enriquecimento. A não utilização deste meio não comprometeu a detecção de 1UFC de *Salmonella* Enteritidis em 25g de maionese.

ARBAULT, POUMEROL [2] desenvolveram um ELISA para detecção de *Salmonella* com dois passos de enriquecimento, utilizando anticorpos anti-flagelina. Foram necessárias 16 a 20 horas de incubação em água peptonada tamponada e 18 a 24 horas de enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis-Soja. Os limites de detecção encontrados foram de 3UFC/25g e 98% de correlação com o método padrão ISO n. 6579.

LEE *et al.* [29] desenvolveram um ELISA para detectar *Salmonella* Typhimurium em alimentos usando o meio SCDM como único meio de enriquecimento e encontraram que é possível detectar, em chocolate, 10 células/25g. O ELISA padronizado neste trabalho apresentou sensibilidade maior que a encontrada por LEE *et al.* [29] e ARBAULT, POUMEROL [2], detectando 1 célula/25g com uma única etapa de pré-enriquecimento, indicando que a sensibilidade do método é adequada.

TIAN *et al.* [34] descreveram a detecção de *Salmonella* spp. por ELISA sanduíche usando caldo manitol para enterobactérias (EEM) e caldo ácido-brilhante verde-novobiocina cloridopiridinisulfônico (DMPBN). Os tempos de incubação a 42°C foram de 6 horas para o EEM e de 27 horas para o DMPBN. Entretanto, nesse método o antígeno utilizado para a imunização dos animais não foi a flagelina e sim a dulcitol 1-fosfato desidrogenase, enzima que fermenta o dulcitol e é uma característica metabólica do subgênero *Salmonella* I.

Vários ensaios imunoenzimáticos para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos já foram reportados [2, 3, 6, 9, 13, 16, 19, 26, 29, 31, 33, 37, 38]. Além disso,

vários métodos ELISA estão disponíveis comercialmente na forma de kits [3, 14]. Porém, o custo é muito elevado para a maioria dos laboratórios brasileiros, principalmente para aqueles oficiais de diagnóstico de toxinfecção alimentar. Assim sendo, o ensaio desenvolvido neste trabalho, após ser validado, poderá ser utilizado por laboratórios com recursos limitados para a compra de kits rápidos de detecção de patógenos.

4 – CONCLUSÕES

- A avaliação das reações cruzadas mostrou que o anti-soro tem pouca reação cruzada com os sorotipos Typhimurium, Infantis e Newport, como também, com outras enterobactérias testadas.
- O conjugado peroxidase manteve-se estável durante dois meses a 4°C e o seu uso deve ser exclusivamente durante este tempo.
- A sensibilidade do ensaio em microplacas com conjugado peroxidase obtido com anti-flagelina de *Salmonella* Enteritidis foi de 10⁴ células/mL, quando testado em cultivo puro.
- O ensaio padronizado apresentou simplicidade e rapidez, com sensibilidade de 1 célula/25g de maçã e batata e cenoura, após 24 horas de incubação em água peptonada tamponada. Entretanto, é necessária a validação do método através da análise de diferentes alimentos contaminados natural e artificialmente com diferentes sorotipos de *Salmonella*.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCOCER, I. *Salmonella* spp. : Padronização de ensaio imunoenzimático para detecção em alimentos. Londrina, 1999. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL).
- [2] ARBAULT, P. ; POUMEROL, S. diffchamb.tech@wanadoo.fr. *Salmonella* detection in food: study of a two-step enrichment protocol combined with an ELISA. enviado no dia 12/09/99, 12h40min. Mensagem para tereza@uel.br.
- [3] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC [on line] disponível na internet via www uel: <http://www.aoac.org/testkits/microbiologykits.htm>. Arquivo capturado em 6 de novembro de 2001.
- [4] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16.ed. Virginia: AOAC, 1995. Cap. 17, p. 55-95.
- [5] BAAY, M.F.D.; HUIS in't VELD, J.H.J. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 74, p. 243-247, 1993.
- [6] BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp. : a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 363-374, 1991.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível na Internet via www uel: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em 08 de janeiro de 2002.
- [8] BRIGMON, R.L.; ZAM, S.G.; BITTON, G.; FARRAH, S.R. Detection of *Salmonella* Enteritidis in environmental samples by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 152, p. 135-142, 1992.
- [9] BRIGMON, R.L.; ZAM, S.G.; WILSON, H.R. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with enzyme-linked immunosorbent assay. **Poultry Science**, v. 74, p. 1232-1236, 1995.
- [10] CAMARGO, N. J.; SOUZA, I. L.; PUZYNA, I. P. ; PESTANA, A. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos em 1998**. Curitiba: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1999.
- [11] CENTER FOR DISEASE CONTROL –CDC [on line] disponível na internet via www uel: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis-g.htm>. Arquivo capturado em 11 de outubro de 2002.
- [12] CHEN, S.; YEE, A.; GRIFFITHS, M.; WU, K.Y.; WANG, C.N. ; RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A. A rapid, sensitive and automated method for detection for *Salmonella* species in foods using AG-9600 amplisensor analyzer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 314-231, 1997.
- [13] ENTIS, P. Validation of the ISO-GRID 2-day rapid screening method for detection of *Salmonella* spp. in egg products. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 555-558, 1996.
- [14] FENG, P. Commercial assay systems for detecting foodborne *Salmonella*: a review. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 11, p. 927-934, 1992.
- [15] FEY, H.E.; PFISTER, H.; RUEGG, O. Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B e D. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 34-38, 1984.
- [16] FLINT, S.H.; HARTLEY, N. J. Evaluation of the TECRA immunocapture ELISA for the detection of *Salmonella typhimurium* in foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, p. 4-6, 1993.
- [17] FLOWERS, R.S. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. **Food Technology**, v. 39, n. 3, p. 103-108, 1985.
- [18] FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica: uma revisão. **Bol SBCTA**, v. 33, n. 2, p. 229-2234, 1999.
- [19] GAZZAZ, S.S.; RASCO, B.A.; DONG, F.M. Application of immunochemical assays to food analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 197-229, 1992.
- [20] HAMMACK, T.S.; AMAGUAÑA, R.M.; JUNE, G.A.; SHERROD, P. S.; ANDREWS, W.H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbial load. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 16-21, 1999.
- [21] HANAI, K.; SATAKE, M.; NAKANISHI, H.; VENKATESWARAN, K. Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 775-778, 1997.

- [22] HASSAN, J.O.; BARROW, P. A.; MOCHETT, A.P. A.; McLEOD, S. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. **Veterinary Record**, v. 126, n. 21, p. 519-522, 1990.
- [23] HOLT, P. ; GAST, R.K.; GREENE, C.R. Rapid detection of *Salmonella enteritidis* in pooled liquid egg samples using a magnetic bead- ELISA system. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 9, p. 967-972, 1995.
- [24] HONGSHENG, H.; GARCIA, M.M.; BROOKS, B.W.; NIELSEN, K.; SZE-PARK, N. G. Evaluation of culture enrichment procedures for use with Salmonella detection immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, n. 2/3, p. 85-94, 1999.
- [25] IBRAHIM, G.F.; FLEET, C.H.; LYONS, M.J.; WALKER, R.A. Immunological relationships between *Salmonella* flagelina and between these and flagellins from other species of Enterobacteriaceae. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 174, p. 87-99, 1985.
- [26] IBRAHIM, G.F.; LYONS, M.J. Detection of Salmonellae in foods with an enzyme immunometric assay. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 1, p. 59-61, 1987.
- [27] ITANO, E. N. Formas moleculares de receptor para eritrócitos de carneiro em linfócito T, soro e saliva. São Paulo, 1989. 156p. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- [28] JUNE, G.A.; SHERROD, P. S.; ANDREWS, W. Comparison of two enzyme immunoassay for recovery of *Salmonella* spp. from four low-moisture foods. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 8, p. 601-604, 1992.
- [29] LEE, H.A.; WYATT, G.M.; BRAMHAM, S.; MORGAN, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1541-1546, 1990.
- [30] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-275, 1951.
- [31] MANTTINGY, J.A.; GEHLE, W.D. An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 807-809, 1984.
- [32] OLIVEIRA, T.C.R.M. Produção de reagentes imunológicos para a detecção direta de enterotoxina estafilocócica A em alimentos. Londrina, 1994. 124p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL).
- [33] 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. Aliment.**, v. 21, n. 3, p. 261-266, 2001.
- [34] TIAN, H.; MIYAMOTO, T.; OKABE, T.; KURAMITSU, Y.; HONJOH, K.; HATANO, S. Rapid detection of *Salmonella* spp. in foods by combination of a new selective enrichment and a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies against dulcitol 1-phosphate dehydrogenase. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 11, p. 1158-1163, 1996.
- [35] TIMONEY, J.F.; SIKORA, N. ; SHIVAPRASAD, H.L.; OPITZ, M. Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a g, m flagellin-based ELISA. **Veterinary Record**, v. 127, n. 7, p. 168-169, 1990.
- [36] WILSON, M.B.; NAKANE, P. K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPPP, W. K.; HOLUBAR, K.; WICK, G. (Ed). **Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam: North-Holland Biomedical Press, 1978. p. 215-224.
- [37] WYATT, G.M. **Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins**. London: Chapman & Hall, 1992. 129p.
- [38] WYATT, G.M.; LANGLEY, M.N. ; LEE, H.A.; MORGAN, M.R.A. Further studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1383-1390, 1993.
- [39] WYATT, G.M.; LEE, H.A.; DIONYSIOU, S.; MORGAN, M.R.A.; STOKELY, D.J.; AL-HAJJI, A.H.; RICHARDS, J.; SILLIS, A.J.; JONES, P. H. Comparison of a microtitration plate ELISA with a standard cultural procedure for the detection of *Salmonella* spp. in chicken. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 3, p. 238-243, 1995.
- [40] YOSHIMASU, M.A.; ZAWISTOWSKI, J. Application of rapid dot blot immunoassay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in eggs, poultry, and other foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 459-461, 2001.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES através do Programa de Estudantes de Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG pela concessão de bolsa, assim como à equipe do Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração na parte experimental.