

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS
BASEADOS EM MALDI-TOF MS PARA A DETECÇÃO DE *Salmonella*
sp. EM LINGUIÇA DE FRANGO TIPO FRESCAL**

LUANA SOUSA SILVA

Belo Horizonte

2019

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS
BASEADOS EM MALDI-TOF MS PARA A DETECÇÃO DE *Salmonella*
sp. EM LINGUIÇA DE FRANGO TIPO FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientadora:

Profa. Elisabeth Neumann - Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

Co-orientadora:

Profa. Andréia Marçal da Silva - Departamento de Engenharia de Alimentos, UFSJ

Belo Horizonte

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde, me dando oportunidades de alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Jésus, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo, Elton, pelo amor incondicional e compreensão os momentos mais difíceis.

Ao meu irmão, Mateus, pelo apoio.

A Prof^a. Dr^a. Elisabeth Neumann, pelo carinho, oportunidade e os ensinamentos.

A Prof^a. Dr^a. Andréia Marçal, que de colega de trabalho passou e me co-orientar. Agradeço o apoio e as oportunidades.

A Prof^a. Dr^a. Joana Ribeiro da Glória, pelo carinho e disponibilidade na análise dos dados.

A Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Quintão Lana, por sua disponibilidade e ensinamentos.

A Gabriela Borba Netto Assis e Prof. Dr. Henrique Figueiredo pela colaboração com a realização das detecções por MALDI-TOF MS.

Ao meu chefe Prof. Mateus Junqueira, pelo incentivo a apoio no mestrado.

A Raissa Raquel, por sua disponibilidade e apoio na execução do estudo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Vanessa, Mariana e Edmilson, pelo carinho, apoio e companheirismo em todos os momentos.

A minha amiga e companheira de estrada, Valdênia, com quem compartilhei todos os momentos durante o mestrado.

Aos meus familiares e amigos, pela paciência e compreensão pelas ausências por motivo de estudo.

A todos os funcionários e colegas da UFSJ campus Sete Lagoas, que de alguma forma me incentivaram a sempre lutar pelos meus objetivos.

*“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4,13*

RESUMO

Salmonella sp. está amplamente distribuída na natureza e pode ser proveniente de diversas fontes, sendo contraída principalmente devido à ingestão de alimentos de origem animal contaminados como ovos, carne, frango e leite. Destes, a carne de frango possui um papel importante na epidemiologia da salmonelose humana. O presente trabalho propôs metodologias alternativas, utilizando MALDI-TOF MS para identificação de *Salmonella* sp. recuperadas de alimentos e comparou a eficiência de detecção destas com o método de referência (BAM/FDA, 2018). Foram utilizadas 12 amostras de linguiça de frango tipo frescal comercializadas no município de Sete Lagoas – MG, durante o período de 22/01/2018 a 26/06/2018. Cada amostra foi dividida em 3 porções e duas delas contaminadas intencionalmente com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, em duas concentrações 10 (C1) e 1000 UFC/g (C2). A terceira porção foi considerada controle negativo. As porções foram submetidas aos métodos: Método 1: (BAM/FDA, 2018), Método 2: onde substituiu-se a etapa de identificação bioquímica e sorológica por identificação por MALDI-TOF MS, Método 3: supressão da etapa de enriquecimento seletivo e identificação bioquímica e sorológica. Método 4: supressão da etapa de enriquecimento seletivo e identificação por MALDI-TOF MS. Nas amostras contaminadas intencionalmente com *Salmonella* nas concentrações (C1 e C2) houve recuperação do micro-organismo em 100% das amostras, quando submetidas à metodologia M2, M3 e M4. Esses resultados foram equivalentes aos obtidos pela metodologia de referência. No entanto, as metodologias M3 e M4 não conseguiram detectar a presença de *Salmonella* sp. na amostra controle cujo resultado foi positivo, segundo as metodologias M1 e M2, pois provavelmente estavam presentes em concentrações reduzidas (< 10 UFC/g). Nas concentrações testadas (C1 e C2), foram obtidos 82% e 88% de recuperação *Salmonella* sp. pela metodologia MALDI-TOF MS (M2) e (M1) respectivamente. As metodologias (M3) e (M4) recuperaram 94% de *Salmonella* sp.. O uso da técnica MALDI-TOF MS conferiu precisão e rapidez na identificação do patógeno, reduziu o tempo de análise, além de identificar outras espécies possivelmente presentes no alimento.

Palavras-chave: metodologia de referência, salmonelose, Espectrometria de massa, linguiça de frango tipo frescal.

ABSTRACT

Salmonella sp. is widely distributed in nature and can be sourced from a variety of sources, being contracted mainly due to the ingestion of contaminated animal foods such as eggs, meat, poultry and milk. Of these, chicken meat plays an important role in the epidemiology of human salmonellosis. The present work proposed alternative methodologies, using MALDI-TOF MS to identify *Salmonella* sp. recovered from food and compared this technique the reference method (BAM/FDA, 2018). Twelve samples of fresh-type chicken sausage commercialized in the municipality of Sete Lagoas - MG, during the period from 01/22/2018 to 06/26/2018 were used. They were divided in 3 portions and two of them were intentionally contaminated with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 in two concentrations (10 and 1000 CFU/g), respectively. The third portion was considered negative control. The portions were subjected to methods: Method 1: (BAM/FDA, 2018), Method 2: where the step of biochemical and serological identification was replaced by MALDI-TOF MS identification, Method 3: suppression of the selective enrichment step and biochemical and serological identification. Method 4: suppression of the selective enrichment step and identification by MALDI-TOF MS. In the samples contaminated intentionally with *Salmonella* in the concentrations (C1 and C2), the microorganism was recovered in 100% of the samples when submitted to the methodology M2, M3 and M4. These results were equivalent to those obtained by the reference methodology. However, the M3 and M4 methodologies failed to detect the presence of *Salmonella* sp. in the control sample, which was positive according to the M1 and M2 methodologies, since they were probably present in reduced concentrations (<10 CFU/g). At the concentrations tested (C1 and C2), 82% and 88% of *Salmonella* sp. by the methodology MALDI-TOF MS (M2) and (M1) respectively. The methodologies M3 and M4 recovered 94% of *Salmonella* sp. The use of the MALDI-TOF MS technique conferred precision and rapidity in the identification of the pathogen, reduced the time of analysis, and identified other species possibly present in the food.

Keywords: reference methodology, salmonellosis, mass spectrometry, fresh-type chicken sausage

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

ATCC - *American Type Culture Collection*

BAM/FDA - *Bacteriological Analytical Manual/ Food and Drug Administration*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

DTAs - Doenças transmitidas por alimentos

EFSA - *European Food Safety Authority*

ELISA - *Enzyme-linked immuno sorbent assay*

ESI - *Ionização Electrospray*

EUA - Estados Unidos da América

h - horas

HE - Entérico Hecktoen

ICB - UFMG - Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

IMVIC - Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer, Citrato

IN - Instrução normativa

ISO - *International Organization for Standardization*

Kg - quilogramas

KOH - hidróxido de potássio

LIA – Ágar Lisina Ferro

LPS - lipopolissacarídeo

m/z - massa/carga

MALDI TOF-MS - *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL - mililitros

mm - milímetros

MS - Espectrometria de Massa

°C - graus Celsius

OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RT - PCR - Reação em cadeia da polimerase - tempo real

RV - Rapaport Vassiliadis
SES/MG - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais
SIM - motilidade indol sulfeto
SS - *Salmonella Shigella*
STEC - *Escherichia coli* produtora de toxina shiga
TOF - *Time of Flight*
TSI - Tríplice Açúcar Ferro
TT - Tetrionato
UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por grama
UFSJ - Universidade Federal de São João del-Rei
USDA - *United States Department of Agriculture*
v/v - volume por volume
VMVP - Vermelho de Metila, Voges Proskauer
WHO - Organização Mundial de Saúde
XLD - Xilose Lisina Desoxicolato
% - por cento
SAS - *Statistical Analysis System*
MDA - *Molecular Detection Assay*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo esquemático do funcionamento do MALDI-TOF MS.....	22
Figura 2: Esquema de preparo do inóculo de <i>S. Typhimurium</i> e preparo da etapa de pré-enriquecimento nas concentrações C0, C1 e C2.....	28
Figura 3: Fluxograma das metodologias para detecção de <i>Salmonella</i> sp.....	29
Figura 4: Crescimento de colônias em Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (3a e 3b) C1 (3c e 3d) e C2 (3e e 3f)	30
Figura 5: Crescimento de colônias em Ágar Hektoen (HE) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (5a e 5b) C1 (5c e 5d) e C2 (5e e 5f).....	31
Figura 6: Crescimento de colônias em Ágar <i>Salmonella Shigella</i> (SS) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (5a e 5b) C1 (5c e 5d) e C2 (5e e 5f).....	31
Figura 7: Representação testes bioquímicos para identificação <i>Salmonella</i> sp	35
Figura 8: Etapas da identificação por MALDI-TOF MicroFlex LT (Bruker Daltonics).	36
Figura 9: Ilustração dos resultados do espectro de massa (a). Medição dos escores de identificação (b) e (c).....	37
Figura 10: Crescimento de colônias em meios seletivos e diferenciais Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) nas concentrações C0 (9a), C1 (9b), C2 (9c), Ágar Hektoen (HE) C0 (9d), C1 (9e), C2 (9f) e Ágar <i>Salmonella Shigella</i> C0 (9g), C1 (9h), C2 (9i).....	38
Figura 11: Identificação em MALDI-TOF MS de isolados de <i>Salmonella</i> com alta probabilidade de identificação de espécie.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enumeração de células viáveis de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 (logUFC/ml) nas culturas utilizadas para contaminação intencional das amostras de linguiça de frango tipo frescal.....	40
Tabela 2: Identificação de <i>Salmonella</i> sp. em amostras de linguiça de frango tipo frescal sem contaminação (C0) e intencionalmente contaminadas por <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 nas concentrações 10 (C1) e 1000 UFC/g (C2).....	41
Tabela 3: Isolados positivos e negativos obtidos nos métodos M1, M2, M3 e M4 testados.....	43
Tabela 4: Identificação por MALDI-TOF MS dos isolados de linguiça de frango tipo frescal positivos para <i>Salmonella</i> sp. com score > 2.300.....	44
Tabela 5: Confiabilidade das identificações por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) dos isolados de linguiça de frango tipo frescal.....	46
Tabela 6: Sensibilidade relativa, especificidade relativa e acurácia relativa dos métodos (M2), (M3) e (M4) em relação á metodologia referência (M1).....	48
Tabela 7: Micro-organismos identificados por MALDI-TOF MS nas amostras de linguiça de frango tipo frescal sem contaminação intencional (C0).....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O gênero <i>Salmonella</i>	11
1.2 Salmonelose: aspectos epidemiológicos	13
1.3 O mercado e a indústria de carne de frango	16
1.4 Métodos de detecção de <i>Salmonella</i> sp. em alimentos	18
1.5 MALDI-TOF MS como método alternativo de detecção de <i>Salmonella</i> sp. em alimentos	20
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 O alimento e o micro-organismo	27
4.2 Preparação de amostras para análise	27
4.3 Detecção de <i>Salmonella</i> sp. nas amostras experimentais e controles	28
4.3.1 Método 1 - Metodologia de referência.....	29
4.3.1.1 Prova do Indol.....	32
4.3.1.2 Teste de Vermelho de Metila e Voges Proskauer.....	32
4.3.1.3 Teste do Citrato.....	33
4.3.1.4 Prova da Urease.....	33
4.3.1.5 Teste de descarboxilação da lisina.....	33
4.3.1.6 Detecção do antígeno somático (poli - O).....	34
4.3.1.7 Detecção do antígeno flagelar (poli - H).....	34
4.3.2 Método 2.....	35
4.3.3 Método 3.....	37
4.3.4 Método 4.....	38
4.4 Delineamento experimental e análise estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é caracterizado por bastonetes curtos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, oxidase negativos, catalase positivos e redutores de nitrato. São geralmente móveis com flagelos peritríqueos, com exceção de *Salmonella Galinarum* e *Salmonella Pullorum* (GERMANO; GERMANO 2011; FDA, 2012). Essas bactérias crescem em faixas de temperatura de 7 a 49,5°C, com temperatura ótima de 37°C (GERMANO; GERMANO 2011) e crescem no intervalo de pH de 4 a 7, com pH ideal de 7 (COELHO, 2012).

A nomenclatura para identificação de *Salmonella* é complexa e divergente entre os órgãos de controle, sendo necessária uma padronização para facilitar a comunicação entre os cientistas, os oficiais de saúde e o público (BRENNER et al., 2000).

A Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática dos Procariotos, com objetivo de minimizar as divergências, emitiu o *Opinion* 80 que decidiu que o gênero *Salmonella* é composto pela espécie tipo *S. enterica* que é subdividida em subespécies (TRUPER, 2005). Com a interpretação desse parecer, aliado a interpretação taxonômica de Le Minor & Popoff (1987) e Reeves et al. (1989), o gênero inclui duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, ficando *S. enterica* composta por seis subespécies denominadas *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (TINDALL et al., 2005).

Atualmente, são conhecidos mais de 2500 sorotipos que estão incluídos nas duas espécies (GRIMONT; WEILL, 2007; LAZARO et al., 2008; WHO, 2018). A definição da nomenclatura dos sorotipos pertencentes à *S. enterica* subespécie *enterica* foi proposta baseando-se na região geográfica onde foram isolados pela primeira vez (POPOFF et al., 2001).

Alguns sorotipos de *Salmonella* são classificados devido à especificidade ao hospedeiro. Eles podem ter *habitat* em animais, como o Dublin que é adaptado a bovinos, Choleraesuis e Tiphysuis, que são adaptados a suínos, Pullorum e Galinarum, que são adaptados a aves e Typhi e Paratyphi A, B e C que são adaptados aos seres humanos. Outros sorotipos podem afetar tanto homem como

animais, como é o caso de Enteritidis e Typhimurium que são responsáveis por infecções em uma ampla gama de hospedeiros (LAZARO et al., 2008; WHO, 2018).

A identificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada em estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida a identificação por sorotipos proposta por Kaufman e White 1934, que se baseia na identificação sorológica dos antígenos somáticos “O”, flagelares “H” e de virulência “Vi” (CAMPOS, 2008). Os antígenos “O” são carboidratos, componentes mais externos do lipopolissacarídeo (LPS), responsáveis pela separação do gênero em sorogrupos. O antígeno “H” é de natureza proteica denominada flagelina que compõe os flagelos de salmonelas móveis (CDC, 2011) e podem ocorrer em duas fases denominadas de fase 1 e fase 2 (CAMPOS, 2008). O antígeno “Vi” é formado por um complexo glicoproteico e está presente na estrutura da cápsula. Pode ser expresso apenas nos sorotipos Typhi, Paratyphi e Dublin e está relacionado com a virulência da bactéria (CAMPOS, 2008). Os antígenos “O” e “Vi” são termorresistentes, possuindo capacidade de resistir à temperatura de 100°C por 2 horas e os antígenos “H” são termolábeis (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

As bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* não são exigentes, (GERMANO; GERMANO, 2011) estão amplamente distribuídas na natureza, sendo capazes de colonizar o trato intestinal de vertebrados, incluindo os seres humanos (FDA, 2012; ANDINO; HANNING, 2015). Podem estar presentes em diversos ambientes, se multiplicar em águas contaminadas, restos de alimentos, fezes (GERMANO; GERMANO, 2011) e são capazes de sobreviver por várias semanas em ambientes secos e muitos meses na água (WHO, 2018).

Podem ser provenientes de diversas fontes e contraídas principalmente devido à ingestão de alimentos de origem animal contaminados como ovos, carne, frango e leite, embora possam ser transmitidas por vegetais contaminados por excretas de animais (WHO, 2018). No entanto, sua patogenicidade pode variar de acordo com o sorotipo envolvido, a idade e as condições de saúde do hospedeiro (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Um grande número de animais possui *Salmonella* em seu trato gastrointestinal, como mamíferos, aves domésticas e silvestres, anfíbios e répteis, podendo ser fontes de transmissão para os seres humanos (OIE, 2016). *Salmonella enterica* subespécie *enterica* estão geralmente relacionadas com

animais de sangue quente (UZZAU et al., 2000).

Apesar de *Salmonella* ser um micro-organismo encontrando no trato intestinal das aves, alguns fatores como manejo adequado dos animais na criação, condições higiênicas no abate e manipulação adequada das carcaças podem interferir na ocorrência desse patógeno na carne de frango e seus subprodutos (CARVALHO; CORTEZ, 2005). Esse contato com os alimentos normalmente acontece por contaminação cruzada (GERMANO; GERMANO, 2011), onde a carne de frango, quando inicialmente contaminada, pode ser fonte de infecção para toda a linha de produção, o que pode representar um problema para a indústria e oferecer risco à saúde do consumidor (DICKEL et.al., 2005).

Os sorotipos mais comuns causadores de infecções humanas e presentes em alimentos de origem animal pertencem à subespécie *enterica* (OIE, 2016) e a maioria deles já foram detectados em aves (WHO, 2018). No Brasil, os sorotipos mais frequentes encontrados em carcaças de aves e criadouros são: Enteritidis, Heidelberg, Kentucky, Infantis, Mbandaka, Typhimurium e Senftenberg (KANASHIRO et al., 2005).

1.2 Salmonelose: aspectos epidemiológicos

As doenças de origem alimentar representam um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo e têm ganhado importância devido ao aumento de incidência nos últimos 20 anos (LAW et al., 2015). Os patógenos de origem alimentar que são responsáveis pela maioria dos surtos e doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* produtora de toxina tipo Shiga (STEC).

A *Salmonella* é agente responsável por diversas infecções, incluindo enterites não tifoides e febre tifoide. As enterites não tifoides são causadas por diversos sorotipos, sendo mais frequentemente causadas por Typhimurium e Enteritidis e a febre tifoide por Typhi e Paratyphi (FDA, 2012). Este micro-organismo é um dos principais patógenos responsáveis por causar DTA no Brasil e no mundo (BARANCELLI et al., 2012), representando uma das quatro principais causas de doenças que provocam diarreia (WHO, 2018). No entanto, a maioria dos

casos não são graves, mas podem ser fatais, dependendo das condições do hospedeiro e do sorotipo envolvido (GERMANO; GERMANO, 2011).

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* é responsável por 99% dos casos de salmonelose em humanos (GRIMONT; WEILL, 2007; DIECKMANN et al., 2008). Os sorotipos Enteritidis e Typhimurium são dois dos principais sorotipos que são transmitidos para o homem na maior parte do mundo. Eles habitam uma ampla gama de hospedeiros, podendo causar doenças (WHO, 2018). A infecção por *S. Typhimurium* está associada ao consumo de diversos alimentos (JACKSON et al., 2013), e sua transmissão ocorre via fecal-oral (FEARNLEY et al., 2011). Em 2018, estudos mostraram que o sorotipo Typhimurium pode apresentar perfil de resistência a diversas classes de antimicrobianos usados na medicina, representando um grande problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2018).

A dose infectante de *Salmonella* para humanos é de 10^3 a 10^8 células, mas pode ser menor de acordo com as condições do hospedeiro, como por exemplo em pacientes com sistema imunológico deficiente (MS, 2011).

A Salmonelose humana é uma doença zoonótica muito prevalente, economicamente importante (OIE, 2016), apresentando um grande desafio para a saúde pública devido à presença de *Salmonella* sp. na microbiota de quase todos os animais vertebrados e a possibilidade de veiculação desse micro-organismo através de alimentos contaminados (MS, 2011).

A importância da carne de frango e seus subprodutos como fontes de infecção por *Salmonella* sp. tem sido demonstrada em diversos trabalhos (CARVALHO; CORTEZ, 2005; RALL et al., 2009; HASSANEIN et al., 2011; AZIZ, 2013). O consumo desses alimentos vem crescendo ao longo dos anos e o Brasil, como um dos principais produtores, estabelece por meio de legislações, limites de detecção de micro-organismos patogênicos que podem oferecer risco a saúde. Para produtos prontos para o consumo a legislação brasileira determina ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas de alimento (BRASIL, 2001).

Em 2011, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estimava que, a cada ano, 48 milhões de americanos ficavam doentes, 128 mil eram hospitalizadas e 3 mil morriam devido a DTAs (CDC, 2011). A *Salmonella* continua sendo um dos principais patógenos que causam DTA nos Estados Unidos, e, só no ano de 2012, foi responsável por 40% das infecções bacterianas confirmadas em laboratório, seguido por *Campylobacter* com 35% dos casos. Os

principais sorotipos relacionados foram Enteritidis, Typhimurium, Newport, Javiana (CDC, 2014).

No ano de 2009, os principais sorotipos responsáveis por DTA nos Estados Unidos foram relacionados a fontes animais como frango, suínos, bovinos e perus (CDC, 2009). Segundo a Organização Mundial da saúde (WHO), nos últimos 10 anos, cerca de 75% das doenças que afetaram humanos foram provenientes de contaminação por patógenos de animais e produtos de origem animal (WHO, 2018).

Na Europa, a carne de frango, os ovos e a carne suína são alimentos frequentemente envolvidos na infecção por *Salmonella* sp. (EFSA, 2015). Os sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis e Newport estão entre os isolados mais frequentes em humanos, sendo responsáveis por casos de salmonelose confirmados no ano de 2007. Destes, os sorotipos Enteritidis e Typhimurium foram os mais prevalentes, representando 81% dos casos (EFSA, 2009).

Os registros sobre a prevalência dos sorotipos de *Salmonella* sp. são muito baixos no Brasil (CABRAL et al., 2014). Dos surtos de DTAs registrados pelo Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2017, 92,2% tiveram origem bacteriana onde *Salmonella* foi o agente responsável por 35% dos casos. Em 46,84% dos casos os alimentos envolvidos não foram identificados e 1,78% foram provenientes do consumo de carne de aves *in natura*, processada e miúdos de aves. Só no ano de 2017, foram notificados 598 surtos de DTAs, totalizando 9.320 pessoas doentes e 12 óbitos (MS, 2018). Um grande problema encontrado pelos órgãos de saúde é que as doenças causadas por *Salmonella* sp., exceto pelo sorotipo Typhi, não são de notificação compulsória, dificultando o levantamento de dados e estimativa correta de incidência dos demais sorotipos na população mundial (CRUMP et al., 2004).

No estado de São Paulo, no ano de 2014, foram confirmados 209 surtos de DTAs, com 5.398 casos confirmados de pessoas doentes onde o principal sintoma foi diarreia (93,77%). Dentre os surtos, cinco foram provenientes da ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella*, sendo dois confirmados a presença do sorotipo Enteritidis (SES, 2014).

No Rio Grande do Sul, no período de 2007 a 2012, os principais sorotipos envolvidos em surtos de infecções alimentares foram Enteritidis,

Schwarzengrund e Typhimurium. Dos surtos notificados, 6,52% foram relacionados ao consumo de carne de frango (CAPALONGA et al., 2014).

Em Minas Gerais, no período de 2006 a 2008, as bactérias mais frequentemente isoladas em pacientes com doenças que causam diarreia foram *Salmonella* (76,23%) e *Shigella* (16,67%). Além disso, os sorotipos de *Salmonella* com maior prevalência foram Enteritidis (71,66%) e Typhimurium (6,07%) (ALVES, 2009). Ainda em Minas Gerais, no período de 2010 a 2014, foram investigados 258 surtos de DTAs, onde foram analisadas 470 amostras de alimentos e os micro-organismos mais comumente isolados foram *Staphylococcus* coagulase positiva, *E. coli*, *Clostridium* sulfito redutor, *Bacillus cereus* e *Salmonella* (FAÚLA et al., 2014).

As DTAs, quando afetam um grande número de pessoas, trazem muitos gastos para o governo. Estima-se que nos EUA entre 5 e 6 bilhões de dólares são utilizados anualmente com gastos diretos e perda de produtividade devido a DTAs. Somente a *Salmonella* é responsável por um bilhão de dólares em custos diretos e indiretos. No Brasil, o custo com internações por DTAs relacionadas com diarreia e gastroenterite de origem infecciosa no período de 1999 a 2004 chegou a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (MS, 2005).

1.3 O mercado e a indústria de carne de frango

O mercado de carne de frango no Brasil vem crescendo a cada ano. Com o preço mais acessível, a qualidade e praticidade dos produtos, esse tipo de carne está sendo cada vez mais consumido.

No ano de 2016, o Brasil foi o segundo maior mercado mundial de carne de frango, com produção de 12.900 milhões de toneladas, ficando atrás somente dos EUA, com 18.261 milhões de toneladas (ABPA, 2017). Em 2017, segundo a AVIMIG, a produção aumentou para 13.068 milhões de toneladas (AVIMIG, 2018). Do total de carne de frango produzida no Brasil, 34% é destinada à exportação e 66% é destinada ao consumo interno. O consumo desse tipo de carne vem aumentando desde 2007, quando se registrou consumo de 37,02Kg/hab, alcançando 41,10 Kg/hab. em 2016 (ABPA, 2017).

Durante a criação na granja, as aves podem ser contaminadas por *Salmonella* sp. através da alimentação, água e utensílios contaminados, além de existir a probabilidade de que tal micro-organismo seja veiculado por insetos,

roedores e pássaros silvestres portadores (BRADEN, 2006). Além disso, existe o risco de transmissão vertical, contaminação da carne de frango e ovos destinados ao consumo. Assim, quando presente, a *Salmonella* representa uma ameaça para a produção de frangos (BARANCELLI et al., 2012).

A qualidade da ração destinada às aves possui grande importância na epidemiologia da infecção de *Salmonella* nas granjas (DIANIN, 2016). Corry et al. (2002), demonstraram em seu estudo que sorovares detectados na ração e incubadora estavam presentes nas granjas e em carcaças de frango abatido.

Atualmente, a indústria de alimentos tem se preocupado cada vez mais em garantir o fornecimento de produtos de qualidade e isentos de micro-organismos patogênicos. Mesmo com a adoção de normas de higiene rigorosas, outros fatores podem interferir na qualidade do produto, como a sobrevivência de micro-organismos que podem pertencer à microbiota do alimento e estar presente no ambiente (FRANCHIN, 2008). Um desses micro-organismos é *Salmonella*, que quando presente, mesmo em pequenas concentrações, pode causar doença (BARANCELLI, et al., 2012).

Devido à alta incidência de *Salmonella* em carne de frango, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu a Instrução Normativa (IN) nº20, de 21 de outubro de 2016, com objetivo de implementar um programa de controle e monitoramento para *Salmonella* em estabelecimentos de criação e abate de frangos e perus de corte, buscando a redução do micro-organismo e proteção do consumidor. Além disso, a IN ainda exige que os estabelecimentos de abate de aves devem manter os índices de contaminação de *Salmonella* dentro do limite máximo de amostras positivas aceitáveis (aprox. 20%) (BRASIL, 2016).

Devido aos diversos problemas que *Salmonella* representa em toda a cadeia de produção e comercialização da carne de frango, ressalta-se a importância da implementação de métodos que resultem na redução do tempo de análise do micro-organismo em alimentos, principalmente os de origem animal.

Alguns derivados de carne de frango, como a linguiça de frango tipo frescal, são produtos com elevada atividade de água, vida de prateleira reduzida e não sofrem nenhum tipo de tratamento térmico na indústria para redução da microbiota que pode ser proveniente de diversas fontes como matéria prima contaminada, condições higiênico-sanitárias insatisfatórias nas etapas de processamento (CORRY et al., 2002) bem como vir da microbiota das aves usadas no abate (AMIT-ROMACH,

et al., 2004). Assim, se a matéria prima não atender aos padrões de qualidade microbiológica, a contaminação pode persistir ou aumentar (CARVALHO et al., 2005), podendo ser fonte de veiculação de patógenos ao homem.

1.4 Métodos de detecção de *Salmonella* sp. em alimentos

A rápida identificação de patógenos como vírus, fungos e bactérias presentes em alimentos e no ambiente é essencial para o efetivo diagnóstico, tratamento de doenças e controle de surtos (HO; REDDY, 2010).

A detecção de *Salmonella* sp. é exigida pela legislação brasileira em diversos tipos de alimentos prontos para o consumo (BRASIL, 2001), sendo realizada na rotina de laboratórios públicos e privados que monitoram a qualidade de alimentos. As técnicas incluem etapas de enriquecimento e cultivo que objetivam a recuperação de células injuriadas e aumento da seletividade perante microbiota acompanhante.

Essas técnicas são amplamente utilizadas na rotina em laboratórios de análise de alimentos e apresentam dificuldades tais como, subjetividade na interpretação dos resultados, alto custo em mão de obra e suprimentos, demandam vários dias para obtenção de um resultado positivo, inviabilizando a identificação rápida do micro-organismo (TOMAS et al., 2009; BELL et al., 2016).

Entre as etapas realizadas na detecção de *Salmonella* sp. pela metodologia de referência, a confirmação por meio de testes bioquímicos e sorológicos é a mais cara, trabalhosa e demorada. Diante disso, há um crescente interesse pela implementação de métodos alternativos que possam trazer resultados rápidos e confiáveis (KUSHIDA, 2005).

Assim, se faz necessária a utilização de métodos que oferecem similar especificidade e sensibilidade e que permitam a redução do tempo de análise dos métodos baseados em cultivo. Nos últimos anos, novas tecnologias para identificação microbiana têm surgido, com objetivo de estabelecer métodos eficientes, rápidos e de baixo custo, que garantam a qualidade dos produtos (BIZZINI; GREUB, 2010; BISWAS; ROLAIN, 2013; PAVLOVIC et al., 2013) e que cheguem a um nível de detecção não alcançado por metodologias convencionais atualmente usadas (ASSIS et al., 2011).

A metodologia de referência para detecção de *Salmonella* em alimentos

foi desenvolvida para o isolamento de *Salmonella* sp. mesmo em situações desfavoráveis (SILVA et al., 2010), sendo sensível para detectar a presença ou ausência do micro-organismo.

Esses métodos de referência baseados em cultura para isolamento de *Salmonella* são especificados por organizações internacionais, como ISO (*International Standards Organization*), FDA (*Food and Drug Administration*) e também pelo Brasil (ISO, 2017; FDA, 2018).

Os procedimentos recomendados por esses órgãos de controle seguem quatro etapas básicas: o pré-enriquecimento em caldo não seletivo, o enriquecimento em caldo seletivo, o plaqueamento em meios seletivos e diferenciais e a confirmação por provas bioquímicas e sorológicas (SILVA et al., 2010).

A etapa de pré-enriquecimento se baseia na recuperação de células injuriadas em caldos não seletivos. A etapa de enriquecimento seletivo objetiva restringir o crescimento da microbiota acompanhante, por meio da adição de reagentes inibitórios, promovendo a multiplicação preferencial de bactérias do gênero *Salmonella*. A etapa de plaqueamento em meios seletivos e diferenciais objetiva promover o crescimento preferencial de *Salmonella*, distinguindo-a dos micro-organismos acompanhantes que porventura ainda permaneçam crescendo (SILVA et al., 2010).

A confirmação é realizada por testes bioquímicos como indol, oxidase, fermentação da glicose, lactose, sacarose, produção de sulfeto de hidrogênio, descarboxilação da lisina, produção de urease, fermentação do dulcitol, etc, que fornecem dados fenotípicos do micro-organismo isolado. A confirmação sorológica verifica a presença de antígenos “O”, “Vi” e “H” (SILVA et al., 2010).

Existem diversos métodos alternativos que são aplicados na detecção de *Salmonella* em alimentos, onde destaca-se os moleculares como PCR - BAX System (KUSHIDA, 2005; FRANCHIN, 2008), os imunoenzimáticos como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Elisa) pelo Kit TECRA (DICKEL et al., 2005), e identificação bioquímica pelo kit API - *Analytical Profile Index* (ASSIS et al., 2011). Entretanto, devido ao alto custo das análises e dificuldade de execução, esses métodos tornam-se inviáveis para serem aplicados na rotina laboratorial (ASSIS et al., 2011; SPARBIER et al., 2012).

Alguns pesquisadores têm buscado a implementação dos métodos

alternativos para detecção de *Salmonella* em alimentos. Dickel et al. (2005) propuseram a análise comparativa entre a metodologia de referência que estabelece o Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella* (SÃO PAULO, 1995), o ELISA e a PCR para detecção de *Salmonella* em carne de frango contaminada artificialmente e verificaram eficiência de 56,6%, 71% e 75% respectivamente.

Outras técnicas para detecção de *Salmonella* têm surgido, auxiliando na detecção rápida e eficiente do patógeno. Uma delas é a técnica MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass spectrometry*) que está bem implementada em laboratórios de microbiologia clínica e possui alto potencial de detecção de patógenos em alimentos.

1.5 MALDI-TOF MS como método alternativo de detecção de *Salmonella* sp. em alimentos

A espectrometria de massa (MS) é utilizada no estudo da massa dos átomos, moléculas e fragmentos de moléculas, baseando-se nas propriedades físicas para determinar a razão entre a massa e carga (m/z) dos analitos ionizados (AEBERSOLD; MANN, 2003).

A MS foi utilizada por várias décadas no campo da Química e, no ano de 1975, Anhalt e Fenselau propuseram seu uso na caracterização bacteriana, através do uso de células inteiras (ANHALT; FENSELAU, 1975).

Atualmente, é aplicada na identificação bacteriana em surtos de doenças transmitidas por alimentos, controle de qualidade da água, em testes de resistência ou suscetibilidade à antimicrobianos, diagnósticos rápidos de doenças infecciosas (CHENG et al., 2016), podendo ser uma ferramenta promissora em pesquisas na área alimentícia, industrial e ambiental.

Existem diversos métodos de ionização e vaporização de moléculas, sendo seus usos determinados de acordo com a natureza da amostra e o objetivo da análise espectrométrica. Os métodos *Electrospray Ionization* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) são utilizados em uma variedade de moléculas não voláteis, tais como as proteínas (SAUER; KLIEM, 2010).

Na década de 80, o desenvolvimento da técnica MALDI-TOF MS permitiu a análise de uma ampla gama de moléculas de alta massa molecular (TANAKA et al.,

1988) e vem ganhado espaço na microbiologia clínica (SENG et al., 2009), sendo utilizada na identificação de um amplo espectro de bactérias (BIZZINI; GREUB, 2010) tais como *Enterobacteriaceae* (CONWAY et al., 2001), dentre elas a *Salmonella* (DIECKMANN et al., 2008; DIECKMANN; MALORNY, 2011), bactérias não fermentativas (MELLMANN et al., 2009), *Vibrio* spp. (DIECKMANN et al., 2010), micobactérias (HETTICK et al., 2006), além de vírus e fungos (GIEBEL et al., 2010).

Inicialmente, a identificação bacteriana por MS era realizada pela quantificação dos ácidos graxos polares que representam de 5 a 8 % do peso seco da célula bacteriana. Atualmente, é muito utilizada a quantificação de proteínas que representam de 60 a 70% do peso seco da célula bacteriana (MURRAY, 2012). Isso pode permitir a identificação de bactérias em nível de espécie e, em alguns casos, subespécie (SAUER; KLIEM, 2010; DIECKMANN et al., 2008) e até sorotipos (KUHNS et al., 2012). As proteínas ribossomais são frequentemente utilizadas devido a sua abundância (MURRAY, 2012) e a alta conservação na célula bacteriana (DIECKMANN et al., 2008).

Na técnica MALDI-TOF MS, a amostra é inicialmente embebida em um ácido orgânico chamado de matriz, bombardeada por um laser, onde é ionizada e desorvida. Os íons formados são acelerados por um campo elétrico através de um tubo de vácuo, onde são separados de acordo com a massa/carga (m/z) (Figura 1). O tempo de voo (TOF) é caracterizado pelo tempo que a amostra ionizada leva para chegar ao detector e depende da massa e da carga do íon (CLARK, et al., 2013). Os compostos de matriz ácido 2,5 dihidroxi-benzoico (DHB) e ácido α ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) são bastante utilizados em diversas aplicações no campo da microbiologia (WELKER; MOORE, 2011).

Na técnica MALDI-TOF MS, um perfil de proteínas presentes em uma dada cultura bacteriana é gerado e comparado com um espectro depositado em um banco de dados de referência para identificação do micro-organismo (ALATOOM et al., 2011; CLARK et al., 2013; PATEL, 2013; PAVLOVIC et al., 2013). É utilizada uma faixa de massa de 2 a 20 kDa, que representa principalmente as proteínas ribossomais, juntamente com outras proteínas domésticas (*housekeeping*) (SINGHAL et al., 2015). O processo de leitura de uma amostra na placa alvo pode levar menos que 30 segundos para realizar uma identificação (WELKER; MOORE 2011).

Após a comparação, uma lista de possíveis micro-organismos é gerada,

indicando o nível de confiança da identificação (*score*). O espectro de massa gerado é individual, sendo único para cada micro-organismo, com picos específicos para gêneros, espécies e sorotipos (PATEL, 2013).

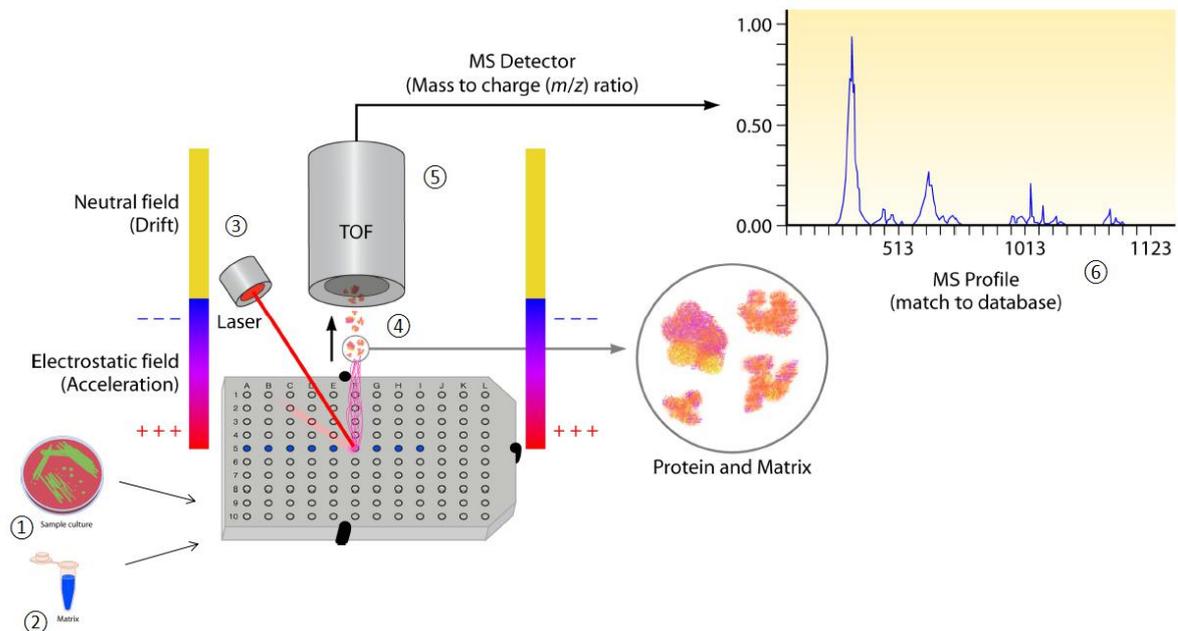


Figura 1: Modelo esquemático do funcionamento do MALDI-TOF MS.

Nota: A colônia isolada obtida a partir de meio de cultura é aplicada diretamente sobre a placa de análise do equipamento (1). As amostras são então cobertas com a solução matriz (2). Após a secagem, as amostras são bombardeadas por um *laser* (3). Este bombardeamento resulta na sublimação e ionização do conteúdo da amostra (4). Os íons formados são acelerados em um campo eletrostático e são posteriormente separados com base na sua razão massa/carga através do tempo de voo das proteínas ionizadas (5). Um espectro de massas é gerado (6) e o perfil é comparado com um banco de dados de espectros de referência para a identificação do micro-organismo contido na amostra.

Fonte: Clark et al., (2013).

A técnica MALDI-TOF MS permite a identificação bacteriana pelo método direto, onde uma colônia bacteriana isolada em meio de cultura é transportada diretamente para o equipamento ou por meio da extração de proteínas por ácido fórmico e acetonitrila (ALATOOM et al., 2011). Na análise de células inteiras, as etapas de preparo e análise possuem a vantagem da conveniência, rapidez e facilidade de execução (WELKER; MOORE, 2011). Desta forma, a capacidade de identificação de micro-organismos por esta técnica pode ser aplicada em diversas áreas incluindo diagnósticos médicos, monitoramento ambiental e controle de qualidade em alimentos (CROXATTO et al., 2012). Estudos anteriores mostraram que a técnica de identificação direta apresentou resultados satisfatórios para micro-

organismos Gram negativos (CHERKAOUI et al., 2010; VAN VEEN et al., 2010; SAFFERT et al., 2011), não sendo necessária a extração de proteínas.

Apesar de uma única colônia ser suficiente para identificação direta por MALDI-TOF MS, em muitos casos, devido à complexidade do micro-organismo, são necessários métodos de cultivo e enriquecimento que podem favorecer o crescimento e a identificação (SAUER; KLIEM, 2010).

A eficiência de identificação pela técnica é alta. Estudos anteriores mostraram que a técnica tem sido utilizada na identificação de micro-organismos Gram negativos e Gram positivos com precisão na identificação de 95,4% (SENG et al., 2009). Van Veen e seus colaboradores (2010) avaliaram 327 isolados abrangendo fungos e bactérias enquadrados em 29 espécies e 80 gêneros e constatando que 95,1% foram identificados corretamente por MALDI-TOF MS. Em outro estudo, para análise de *Enterobacteriaceae*, as identificações corretas em nível de gênero foram de 100% dos isolados e 96,6% em nível de espécie, enquanto as bactérias Gram negativas não fermentadoras de glicose apresentaram nível de identificação correta para gênero de 81,8% e 74,5% em nível de espécie (SCHAUMANN et al., 2013). Esse estudo demonstrou que a técnica MALDI-TOF MS possui um potencial de distinguir entre as espécies intimamente relacionadas e subespécies de *Enterobacteriaceae*.

Dieckmann et al. (2008) demonstraram que a técnica foi eficaz na identificação de linhagens de *Salmonella enterica* em nível de subespécie. Segundo os autores, a expressão dos íons biomarcadores de gênero, espécie e subespécie são bastante estáveis em diferentes condições de cultivo. Assim, quando cultivados em diferentes meios de cultura como Ágar sangue (base) Muller Hinton, Ágar sangue (base) Colúmbia, Ágar Colúmbia, Ágar padrão de contagem e Ágar (sangue) (5% sangue de ovelha), os micro-organismos apresentaram comportamentos semelhantes. Segundo Welker e Moore (2011), o espectro de massa gerado na identificação de células inteiras de micro-organismos cultivados em diferentes condições e idade de cultivo é estável.

Cherkaoui et al. (2010), comparando a metodologia MALDI-TOF MS com métodos de identificação fenotípica usados na rotina laboratorial clínica para identificação de 720 isolados bacterianos (morfologia das colônias em placas de ágar, testes bioquímicos e identificação suplementar por API e Vitek-2) verificaram que a acurácia entre os métodos foi superior a 99%. Além disso, os autores também

verificaram a eficiência entre dois espectrômetros de massa das marcas Bruker e Shimadzu que apresentaram 680 e 639 identificações corretas, respectivamente.

Van Veen et al. (2010) e Schaumann et al. (2013), comparando a eficácia da metodologia MALDI-TOF MS em relação a identificação bioquímica automatizada por Vitek-2, demonstraram que as metodologias apresentam alto grau de concordância. Ressalta-se que ambas as metodologias são amplamente aplicadas para identificação bacteriana (SCHAUMANN et al., 2013).

Em 2013, a *Food and Drug Administration* (FDA) autorizou a comercialização e uso nos Estados Unidos do primeiro espectrômetro de massas MALDI-TOF MS comercializado pela empresa bioMérieux, o VITEK® MS que possui a capacidade de identificar bactérias e leveduras que podem causar doenças aos seres humanos (FDA, 2013a). No mesmo ano, a FDA também aprovou o uso do MALDI-TOF *Biotyper* (Bruker Daltonics) para identificação de bactérias Gram negativas em amostras humanas (FDA, 2013b).

2. JUSTIFICATIVA

A indústria de processamento de carnes tem um grande desafio objetivando oferecer no mercado produtos com qualidade garantida. O crescente aumento no consumo desse tipo de alimento que possui alta perecibilidade, aliado à dificuldade das análises laboratoriais em obter resultados rápidos e precisos para a identificação de *Salmonella* sp. pela metodologia de referência, com conseqüente dificuldade da indústria em aguardar o resultado analítico para liberação do lote, estimula a busca de ferramentas de identificação rápida e eficiente deste e de outros patógenos transmitidos por alimentos. Tais ferramentas certamente irão contribuir para minimizar impactos econômicos e prejuízos à saúde do consumidor.

Dentro deste contexto, a proposta de utilizar a espectrometria de massa para identificação de *Salmonella* sp. em linguiça de frango tipo frescal se apresenta como uma metodologia promissora, podendo encurtar o tempo da análise e apresentar resultados com precisão igual ou superior às metodologias de referência. E ainda, o levantamento de dados bibliográficos demonstrou que a identificação bacteriana por MALDI-TOF MS é um método amplamente utilizado na área da microbiologia, no entanto foi observada a escassez de estudos voltados para aplicação na área de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de uso de metodologias alternativas, utilizando MALDI-TOF MS, para identificação de *Salmonella* sp. recuperadas de alimentos.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar em amostras de linguiça de frango tipo frescal:

- a presença de *Salmonella* sp. seguindo-se todas as etapas da metodologia de referência proposta por (BAM/FDA, 2018), neste trabalho denominado Metodologia 1/M1,

- a presença de *Salmonella* sp. substituindo-se a etapa de identificação bioquímica e sorológica da metodologia 1 por identificação por MALDI-TOF MS, neste trabalho denominado Metodologia 2/M2,

- a presença de *Salmonella* sp. seguindo-se a metodologia de referência, mas suprimindo-se a etapa do enriquecimento seletivo, neste trabalho denominado Metodologia 3/M3,

- a presença de *Salmonella* sp. seguindo-se as etapas de pré-enriquecimento, crescimento em meios seletivos e diferenciais, isolamento e detecção por MALDI-TOF MS, neste trabalho denominado Metodologia 4/M4.

- Comparar o desempenho dos métodos propostos M2, M3 e M4 com a metodologia de referência (BAM/FDA, 2018) (M1).

- Verificar a eficiência e o nível de identificação de *Salmonella* pela técnica MALDI-TOF MS.

- Determinar a acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos propostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Alimento e o micro-organismo

Foram utilizadas nos experimentos doze amostras de linguiça de frango tipo frescal, comercializadas em pacotes 500g, de uma única marca, adquiridas em estabelecimentos registrados da cidade de Sete Lagoas - MG, no período de 22/01/2018 a 26/06/2018.

As unidades amostrais foram coletadas em embalagens originais, transportadas sob refrigeração (caixa isotérmica contendo gelo reciclável) e analisadas, no máximo, após 2 horas da coleta no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal de São João del-Rei - Campus Sete Lagoas.

Para contaminação intencional das linguiças, foi utilizada a linhagem *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG).

A linhagem foi conservada em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck, Darmstadt, Alemanha) acrescido de 30% de glicerol 80% (v/v) esterilizado e armazenado em *freezer* -80 °C. Antes da sua utilização, a linhagem foi ativada por dois repiques sucessivos em Caldo BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha), em aerobiose, incubados por 24±2h a 35±2°C.

4.2 Preparação das amostras para análise

Foram realizadas diluições (10^{-1} a 10^{-9}) do inóculo de *S. Typhimurium* em água peptonada 0,1% (Acumedia Lansing, Michigan), e a confirmação da concentração de células viáveis foi realizada através de contagem em placas pelo método de espalhamento em superfície em Ágar BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubadas por 24±2h a 35±2°C (APHA, 2001) .

Cada amostra foi dividida em três porções onde duas delas foram contaminadas intencionalmente com inóculo de *S. Typhimurium* a terceira foi considerada controle.

Após determinação da concentração das células viáveis em ágar BHI, foram selecionadas as diluições 10^{-6} e 10^{-4} do inóculo para contaminação intencional de duas porções das amostras nas concentrações 10 UFC/g (C1) e 1000 UFC/g (C2), respectivamente (amostras experimentais). À terceira porção da amostra, que foi considerada controle (C0), não houve adição do patógeno.

Para contaminação intencional, uma alíquota de 1 mL de cada diluição do inóculo (10^{-6} e 10^{-4}) foi retirada e adicionada em um saco estéril contendo 25 gramas de linguiça. Imediatamente após a adição do inóculo foram adicionados 225 mL de Caldo Lactosado e realizada homogeneização por dois minutos em *stomacher* (Marconi) e incubação por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (pré-enriquecimento). Na amostra controle (C0), foram pesados 25 gramas da linguiça e adicionados 225 ml da Caldo Lactosado e realizada homogeneização por dois minutos em *stomacher* (Marconi) e incubação por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (pré-enriquecimento). A partir do pré-enriquecimento foram realizadas as análises de acordo com os quatro métodos propostos, conforme Figura 2.

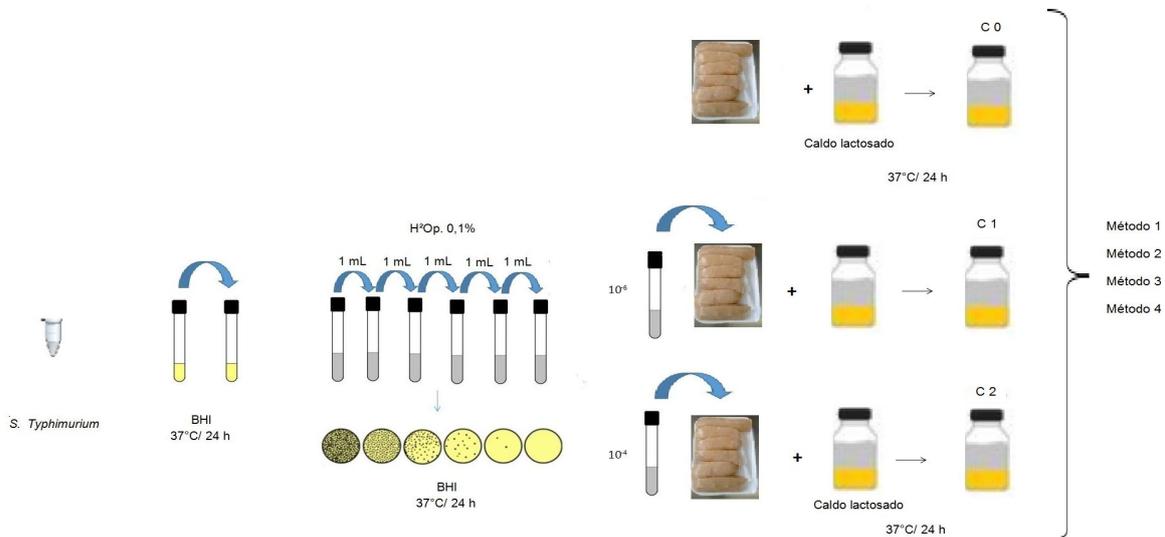


Figura 2: Esquema de preparo do inóculo de *S. Typhimurium* e preparo da etapa de pré-enriquecimento nas concentrações C0, C1 e C2.

4.3 Detecção de *Salmonella* sp. nas amostras experimentais e controles

As porções foram submetidas à análise de *Salmonella* sp. por quatro métodos:

Método 1 – Metodologia de referência descrita por (BAM/FDA, 2018), que estabelece: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios seletivos e diferenciais, identificação dos isolados por testes bioquímicos e sorológicos;

Método 2 - Etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios seletivos e diferenciais, identificação dos isolados por MALDI-TOF MS;

Método 3 - Etapas de pré-enriquecimento, plaqueamento direto em meios seletivos e diferenciais, identificação dos isolados por testes bioquímicos e sorológicos;

Método 4 - Etapas de pré-enriquecimento, plaqueamento direto em meios seletivos e diferenciais, identificação dos isolados por MALDI-TOF MS.

O fluxograma das análises está representado na Figura 3.

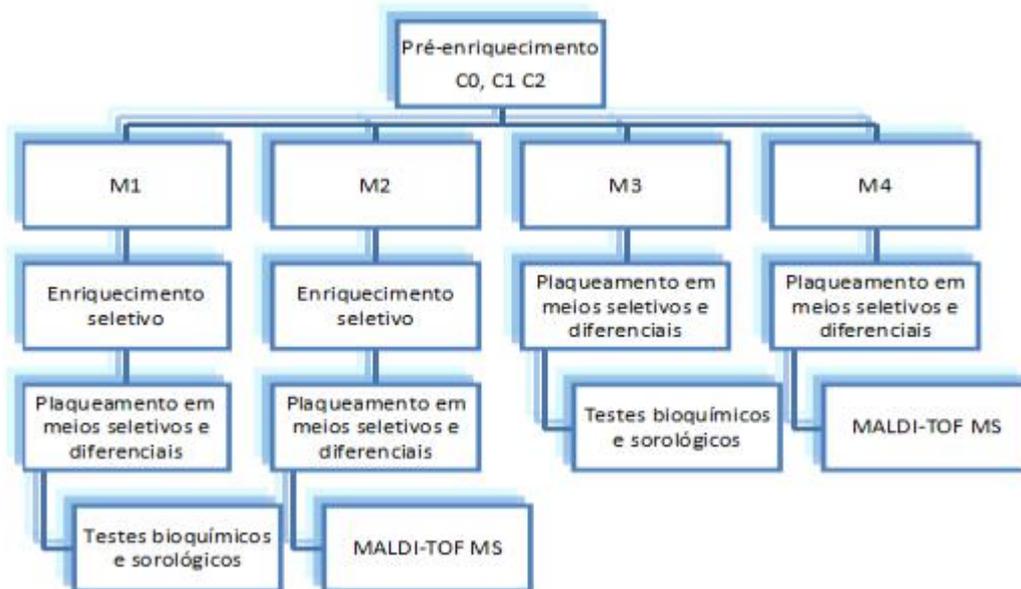


Figura 3: Fluxograma das metodologias para detecção de *Salmonella* sp..

4.3.1 Método 1 – Metodologia de referência

A partir do pré-enriquecimento nas concentrações (C0), (C1), e (C2), uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para tubos contendo 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Acumedia Lansing, Michigan) e 1 mL para 10 mL de Caldo

Tetrationato (TT) (Acumedia Lansing, Michigan). O caldo RV foi incubado por 24 ± 2 h a $42\pm 0,2$ °C (banho Maria) e o caldo TT foi incubado por 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C.

Os tubos de enriquecimento seletivo foram homogeneizados e estrias por esgotamento, partindo do Caldo TT, foram realizadas em placas de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Merck, Darmstadt, Alemanha), Ágar Entérico Hektoen (HE) (Oxoid, Basingstoke) e Ágar *Salmonella Shigella* (SS) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Esse procedimento foi repetido com o Caldo RV. As placas foram incubadas invertidas por 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C e foi observada a ocorrência de colônias típicas de *Salmonella* sp.

A metodologia de referência (BAM/FDA, 2018) foi usada com modificações substituindo o meio seletivo e diferencial Bismuto Sulfito (BS) pelo *Salmonella Shigella* (SS) recomendado por APHA, 2001.

Uma colônia típica de cada placa de Ágar foi selecionada (Figuras 4,5 e 6) e inoculada em tubo inclinado de Ágar Lisina Ferro (LIA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) inclinado (Kasvi, Itália).

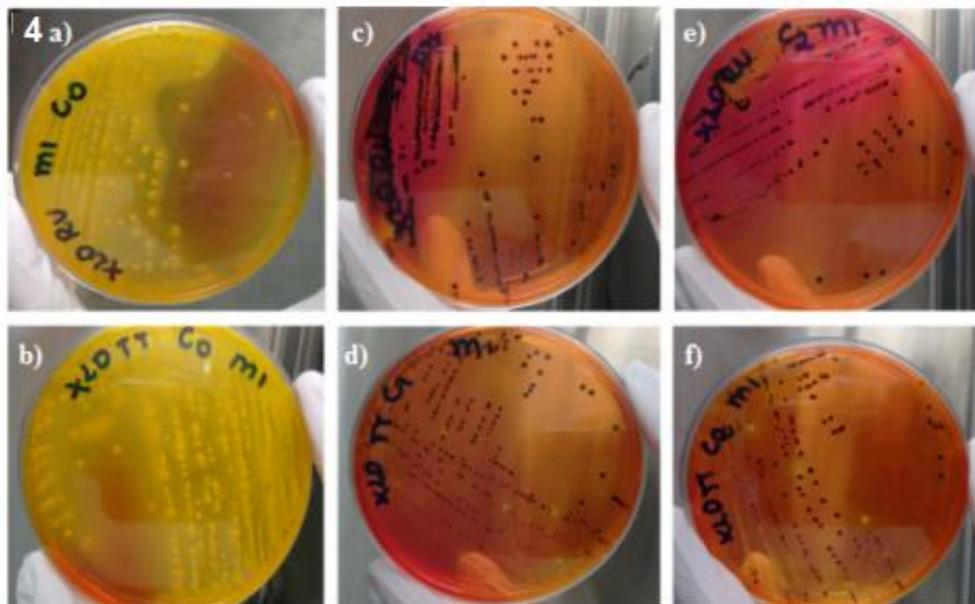


Figura 4: Crescimento de colônias em Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (4a e 4b) C1 (4c e 4d) e C2 (4e e 4f). No Ágar XLD, *Salmonella* sp. produz colônias rosa escuro ou vermelhas com centro negro.

Fonte: autor (2018).

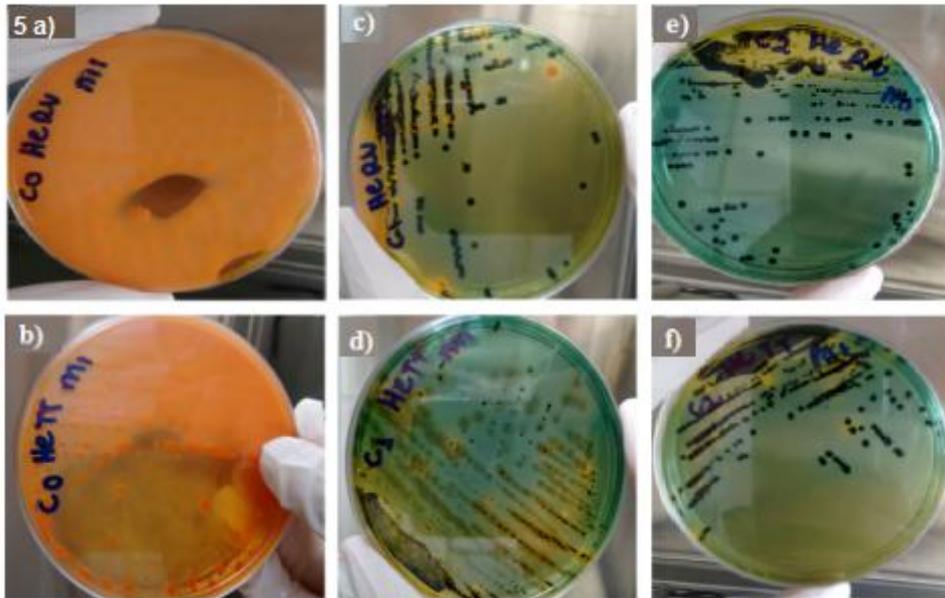


Figura 5: Crescimento de colônias em Ágar Hektoen (HE) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (5a e 5b) C1 (5c e 5d) e C2 (5e e 5f). No Ágar HE, *Salmonella* sp. produz colônias verde azuladas com centro negro.

Fonte: autor (2018).

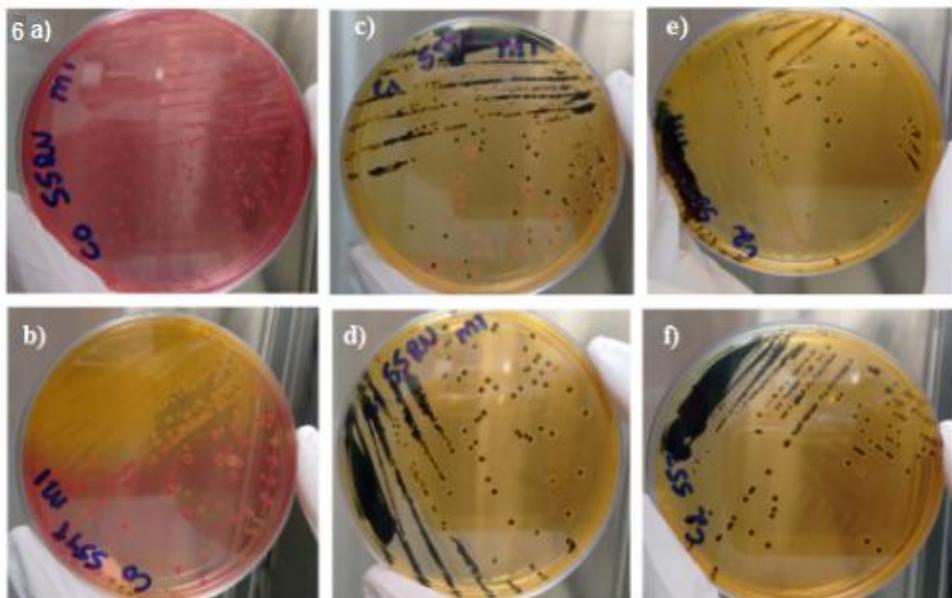


Figura 6: Crescimento de colônias em Ágar *Salmonella Shigella* (SS) obtidas dos caldos TT e RV nas concentrações C0 (6a e 6b) C1 (6c e 6d) e C2 (6e e 6f). No Ágar SS, *Salmonella* sp. produz colônias incolores com centro negro.

Fonte: autor (2018).

Os tubos de LIA e TSI foram incubados por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e foi observado se havia ocorrência de reação típica sugestiva de *Salmonella* sp. (Figura 7 a,b).

A confirmação definitiva foi realizada através das provas de Indol, Vermelho de metila, Voges-Proskauer, Citrato, Urease, Descarboxilação da lisina e Sorologia antígenos “O” e “H”.

Os testes bioquímicos usados foram selecionados de acordo com os resultados dos primeiros experimentos onde verificou-se os mais adequados para diferenciação dos micro-organismos encontrados na linguiça de frango.

Os testes sorológicos somáticos e flagelares foram feitos em lâmina de acordo com a metodologia de referência ISO 6579 (2017). Antes da realização dos testes foi realizada comparação da eficiência destes com o preconizado pela metodologia (BAM/FDA 2018) onde foram verificados resultados concordantes.

Foram considerados *Salmonella* sp. as culturas isoladas com resultados de LIA e TSI sugestivos, Indol negativo, Vermelho de Metila positivo, Voges-Proskauer negativo, Citrato positivo, Urease negativa, Descarboxilação da Lisina positiva e Testes Sorológicos Somático e Flagelar positivos.

4.3.1.1 Prova do Indol

Uma alçada da cultura do tubo de Ágar TSI foi transferida através de picada no centro do tubo contendo 5 mL do meio SIM (Sulfeto, indol e motilidade) (Himedia Mumbai, India). O tubo foi incubado por 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C. Após incubação foram adicionados 0,2 mL de Reagente de Kovacs (Merck, Darmstadt, Alemanha). A formação de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura indica resultado indol positivo (Figura 7c).

4.3.1.2 Teste do Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (VM-VP)

Uma alçada da cultura do tubo de Ágar TSI foi transferida para tubo contendo 6 mL de caldo VM-VP (Himedia Mumbai, India) e incubado por 48h a 37 °C. Para o teste de VP, foram transferidos assepticamente 1 mL da cultura para um tubo de ensaio estéril e adicionados 0,6 mL de solução de α -naftol 5% (Dinâmica). Após agitação, foram adicionados 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 40% (Haloquímica). Após agitação, foi adicionada uma pitada leve de cristais de creatina (Neon). O tubo foi deixado em repouso à temperatura ambiente e a leitura foi

realizada após 4 horas. A cor avermelhada indica teste positivo e o meio inalterado teste negativo (Figura 7 g,h).

A cultura remanescente do caldo VM-VP (5 mL) foi re-incubada por mais 48 horas a 37°C. Após a incubação final de 96 horas foi realizado o teste de VM adicionando 5 gotas de solução de vermelho de metila (0,1g vermelho de metila, 300 mL etanol 95%, completar para 500 mL água destilada). A mudança imediata para a cor vermelha é indicativo de teste positivo e cor amarela teste negativo (Figura 7 e,f)

4.3.1.3 Teste de Citrato de Simmons

Uma alçada da cultura do tubo de Ágar TSI foi transferida para um tubo com Ágar Citrato de Simmons (Himedia Mumbai, Índia) inclinado, picando o fundo. Os tubos foram incubados por 96±2h a 35±2°C e foi observada a viragem alcalina do indicador alterando a cor do meio de verde para azul que indica teste positivo. Um tubo do Ágar não inoculado foi incubado como controle negativo (cor verde) (Figura 7 i, j).

4.3.1.4 Teste de Urease

Uma alçada da cultura do tubo de Ágar TSI foi transferida para um tubo de Ágar Ureia de Christensen (Himedia Mumbai, Índia) inclinados através de estrias na rampa. Os tubos foram incubados por 24±2h a 35±2°C e observada a viragem alcalina do indicador com alteração da cor do meio de pêssego para a cor de rosa que indica teste positivo. Um tubo do Ágar não inoculado foi incubado como controle negativo (cor pêssego) (Figura 7 k, l).

4.3.1.5 Teste de Descarboxilação da lisina

Uma alçada da cultura do tubo de Ágar TSI foi transferida foi inoculada em Caldo Descarboxilase 0,5% Lisina (Himedia Mumbai, Índia), logo abaixo da superfície do líquido e incubado por 24±2h a 35±2°C. Foi observada a turvação e a viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio para roxo azulado, identificado como teste positivo e amarelo teste negativo (Figura 7 m, n).

4.3.1.6 Detecção de Antígenos somáticos (poli O)

Uma colônia típica isolada nos meios seletivos e diferenciais foi purificada em placas contendo Ágar Nutriente (Merck, Darmstadt, Alemanha), incubadas por 24 ± 2 h a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Uma colônia isolada das placas de Ágar Nutriente foi repicada em tubo contendo Ágar Nutriente inclinado e incubado por 24 ± 2 h a $35\pm 2^\circ\text{C}$.

Em uma lâmina de vidro foi adicionada uma gota de antissoro somático polivalente anti-*Salmonella*, que possui anticorpos contra os antígenos “O” dos grupos A, B, C, D e E (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). A partir do tubo de Ágar Nutriente, uma alçada foi retirada e emulsionada na gota de antissoro. A leitura foi realizada em um fundo escuro bem iluminado, fazendo delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina e verificação da aglutinação. O controle negativo foi realizado com a emulsão da cultura em uma gota de solução salina 0,85% na lâmina (Figura 7 o, p).

4.3.1.7 Detecção de Antígenos flagelares (poli H)

A partir dos tubos de Ágar Nutriente (Merck, Darmstadt, Alemanha) inclinado usados para a realização do teste somático, uma alçada do inóculo foi transferida para tubos de Ágar nutriente semissólido (0,4% de Ágar) (Merck, Darmstadt, Alemanha) não inclinado e incubado por 24 ± 2 h a $35\pm 2^\circ\text{C}$.

Em uma lâmina de vidro foi adicionada uma gota de antissoro flagelar polivalente anti-*Salmonella* (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). A partir do tubo de Ágar nutriente semissólido, uma alçada do inóculo foi retirada e emulsionada na gota de antissoro. A leitura foi realizada em um fundo escuro bem iluminado, fazendo delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina movimentando a solução e verificação da aglutinação na amostra com antissoro. O controle negativo foi realizado com a emulsão da cultura em uma gota de solução salina 0,85% na lâmina (Figura 7 q,r).

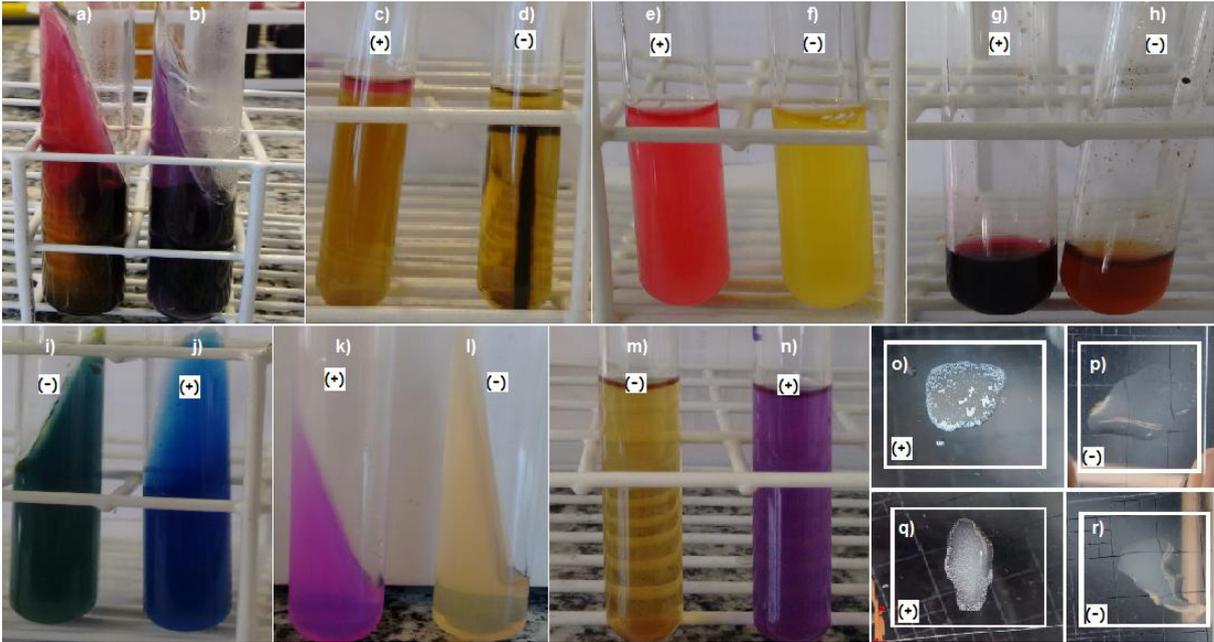


Figura 7: Representação testes bioquímicos para identificação *Salmonella* sp..

a) teste TSI presuntivo para *Salmonella* sp., b) teste LIA presuntivo para *Salmonella* sp., c) teste indol positivo, d) teste indol negativo; e) teste VM positivo, f) teste VM negativo; g) teste VP positivo, h) teste VP negativo; i) teste citrato negativo, j) teste citrato positivo; k) teste urease positiva, l) teste urease negativa; m) teste lisina negativa, n) teste lisina positiva; o) teste sorológico somático positivo, p) teste sorológico somático negativo; q) teste sorológico flagelar positivo; r) teste sorológico flagelar negativo.

Fonte: autor (2018).

4.3.2 Método 2 - Identificação por MALDI-TOF (MS)

A partir de cada placa de HE, SS e XLD da metodologia 1, foram selecionadas as mesmas colônias típicas isoladas e realizadas estrias por esgotamento em placas contendo Ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (RODRIGUES et al., 2017). Na ausência de colônias típicas sugestivas de *Salmonella* sp. outra colônia atípica ou predominante foi selecionada para identificação em MALDI-TOF MS.

Uma colônia isolada, com até 24h de crescimento foi transferida com auxílio de um palito de dentes (Figura 7 a) para a placa de aço alvo (Figura 7 b) e adicionado 1 μl de ácido fórmico (70%) (Figura 7 c). Após a secagem ao ar foi adicionado 1 μl de matriz MALDI-TOF MS (Figura 7 d) (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Aguardou-se a secagem ao ar (Figura 7 e) e a placa foi enviada ao equipamento (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para leitura (Figura 7 f).

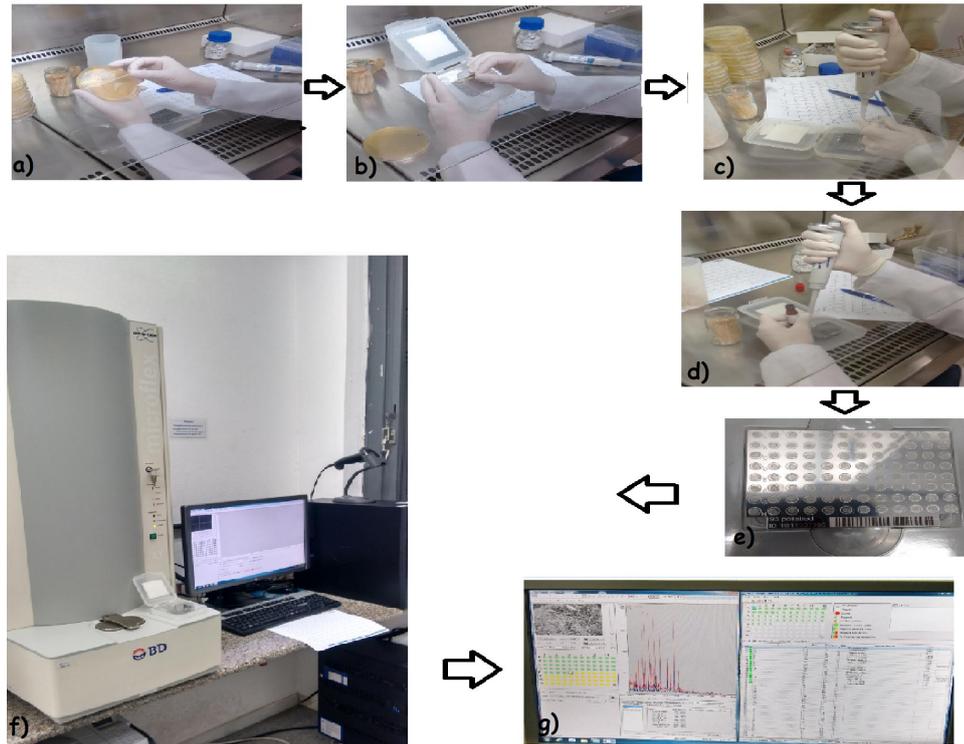


Figura 8: Etapas da identificação por MALDI-TOF MicroFlex LT (Bruker Daltonics).
Fonte: autor (2018).

Os espectros foram adquiridos usando o espectrômetro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com laser de nitrogênio de 60 Hz, com disparos de até 240 tiros de laser em movimentos espirais para coletar 40 disparos para cada ponto de tensão. Os parâmetros para detecção de faixa de massa foram definidos para permitir a identificação de 1.960 a 20.137 m/z, onde a tensão da fonte 1 foi de 19,99 kv, a tensão da fonte 2 foi de 18,24 kv e a tensão da lente foi de 6,0 kv para aquisição de dados.

Antes das medições, foi realizada calibração com o padrão de teste bacteriano (*E. coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics). Os critérios de score de identificação utilizados foram os recomendados pelo fabricante e variaram de 0 a 3 onde escores ≥ 2.300 e ≤ 3000 indicam alta probabilidade de identificação de espécie, escores ≥ 2000 a ≤ 2299 indicam identificação segura de gênero e provável identificação de espécie, escores ≥ 1.700 e < 2.000 indicam identificação provável de gênero e escore < 1.700 não indica identificação confiável (Figura 8).

A biblioteca Bruker é composta por mais de 80 mil espectros, cobrindo 2.048 espécies e 385 gêneros (BILECEN et al., 2015).

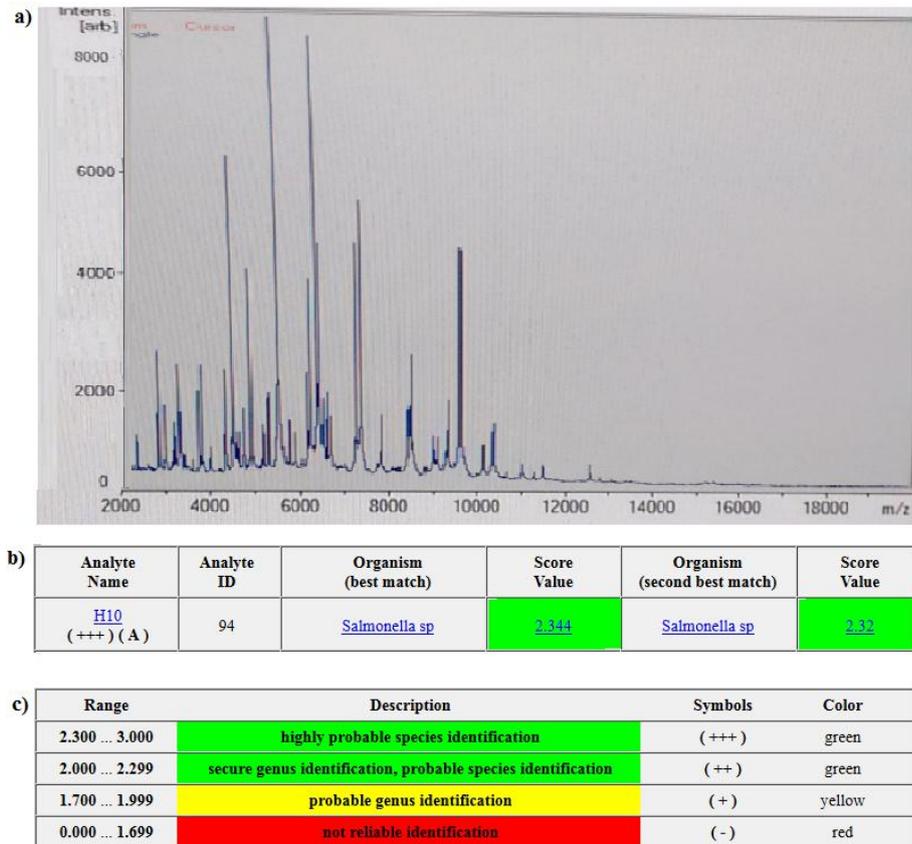


Figura 9: a) Ilustração dos resultados do espectro de massa. b) e c) medição dos escores de identificação.

Fonte: Bruker Daltonics MALDI Biotyper

4.3.3 Método 3 - Supressão da etapa de enriquecimento seletivo

A partir do pré-enriquecimento nas concentrações (C0), (C1) e (C2), após homogeneização, foram realizadas estrias por esgotamento diretamente em placas de Ágar XLD, HE e SS. As placas foram incubadas invertidas por 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C e foi observada a ocorrência de colônias típicas de *Salmonella* sp. (Figura 10). Após o período de incubação, uma colônia isolada de cada placa foi submetida aos testes bioquímicos e sorológicos, conforme descrito para a metodologia 1.

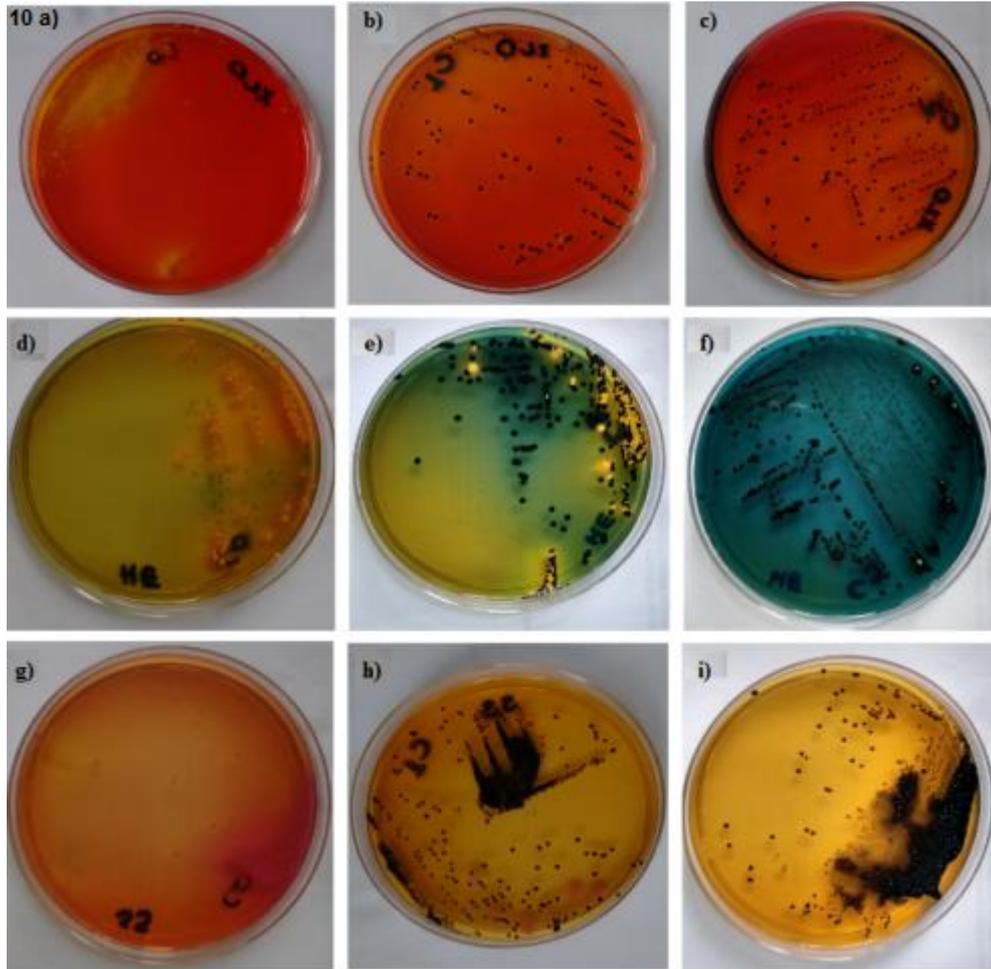


Figura 10: Crescimento de colônias em meios seletivos e diferenciais Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) nas concentrações C0 (10a), C1 (10b), C2 (10c), Ágar Hektoen (HE) C0 (10d), C1 (10e), C2 (10f) e Ágar *Salmonella Shigella* C0 (10g), C1 (10h), C2 (10i).

Fonte: autor (2018).

4.3.4 Método 4 - Supressão da etapa de enriquecimento seletivo e identificação por MALDI-TOF MS

A partir de cada placa de Ágar XLD, HE e SS da metodologia 3, foram selecionadas as mesmas colônias típicas isoladas e realizadas estrias por esgotamento em placas contendo Ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Uma colônia isolada de cada placa de Ágar BHI foi retirada e submetida à identificação por MALDI-TOF MS, conforme descrito para a metodologia 2. Na ausência de colônias típicas sugestivas de *Salmonella* sp. outra colônia atípica ou predominante foi selecionada para identificação em MALDI-TOF MS.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

Antes do início do experimento, foi realizado o cálculo amostral conforme descrito por Sampaio (2015), sendo definido o número mínimo de doze amostras para que os resultados fossem representativos. O presente estudo foi submetido ao delineamento em blocos ao acaso e a análise dos dados foi feita pelo Teste de McNemar no Programa SAS (*Statistical Analysis System*) versão 9.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para um valor de $p < 0,05$. O grau de concordância entre os testes foi estabelecido pelo coeficiente Kappa.

Foram calculadas sensibilidade relativa, especificidade relativa e acurácia relativa para os métodos propostos pelo programa SAS.

A ISO 16140 define sensibilidade relativa como a capacidade do método alternativo detectar uma amostra positiva quando ela é positiva no método de referência. A especificidade relativa é a capacidade do método alternativo detectar uma amostra negativa, quando ela é negativa no método de referência. A acurácia relativa refere-se ao grau de concordância do resultado obtido entre o método testado em relação ao método de referência (ISO, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inóculos de *Salmonella* Typhimurium utilizados para a contaminação intencional das amostras de linguiça de frango apresentaram concentração de células viáveis semelhante em todos os experimentos realizados (Tabela 1).

As metodologias recomendadas para detecção de *Salmonella* sp. em alimentos incluem uma série de etapas que podem demorar até nove dias para obtenção de um resultado confiável. A substituição da identificação utilizando-se testes bioquímicos e sorológicos por MALDI-TOF MS reduziria esse tempo para cinco dias. Essa redução, ainda que interessante, não é tão significativa. Pensando nisso, também foram testadas mais duas metodologias para verificar se ocorreria alteração na sensibilidade do método. Numa delas se fez a supressão da etapa enriquecimento seletivo e finalizou-se com a identificação bioquímica e sorológica (M3) e na outra se fez a supressão da etapa enriquecimento seletivo e finalizou-se com a identificação por MALDI-TOF MS (M4).

Tabela 1: Enumeração de células viáveis de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (UFC/mL) do inóculo utilizadas para contaminação intencional das amostras de linguiça de frango tipo frescal.

Inóculo	Contagem (UFC/mL)
1	1.71x10 ⁹
2	2.50x10 ⁹
3	5.28x10 ⁹
4	2.1x10 ⁹
5	2.75x10 ⁹
6	4.57x10 ⁹
7	4.8x10 ⁹
8	3.87x10 ⁹
9	6.96x10 ⁹
10	3.33x10 ⁹
11	3.2x10 ⁹
12	6.5x10 ⁹

Comparando-se os resultados obtidos das doze amostras que foram contaminadas intencionalmente nas concentrações (C1) e (C2) quando submetidas à metodologia MALDI-TOF MS (M2), 100% foram identificados com presença de *Salmonella* sp.. Resultados equivalentes foram obtidos quando aplicada a identificação pela metodologia de referência (BAM/FDA, 2018). Nas amostras controle

(C0), onde não houve adição intencional de *Salmonella* Typhimurium, os métodos M1 e M2 detectaram a presença do patógeno em uma amostra (8,3%) (Tabela 2).

Nas amostras que foram contaminadas intencionalmente com *Salmonella* Typhimurium nas concentrações (C1) e (C2) houve recuperação do micro-organismo em 100% das amostras também para os métodos M3 e M4 (Tabela 2). Esses resultados mostraram que a técnica MALDI-TOF MS apresentou alto índice de concordância, quando comparada com a identificação bioquímica e sorológica convencional usada. No entanto, as metodologias M3 e M4 não conseguiram detectar a presença de *Salmonella* sp. na amostra controle cujo resultado foi positivo, segundo as metodologias M1 e M2 (C0, amostra 7) (Tabela 2), pois provavelmente estavam presentes em concentrações reduzidas (< 10 UFC/g).

Tabela 2: Identificação de *Salmonella* sp. em amostras de linguiça de frango tipo frescal sem contaminação (controles) (C0) e intencionalmente contaminadas por *S. Typhimurium* ATCC 14028 nas concentrações 10 (C1) e 1000 UFC/g (C2).

Rep.	M1			M 2			M3			M 4		
	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
5	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
6	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
9	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
10	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
11	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
12	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Total	8,3%	100%	100%	8,3%	100%	100%	0%	100%	100%	0%	100%	100%

(+) presença; (-) ausência. Método 1: (BAM/FDA, 2018); Método 2: Etapa de identificação por MALDI-TOF MS; Método 3: Supressão da etapa de enriquecimento seletivo; Método 4: Supressão da etapa de enriquecimento seletivo e identificação por MALDI-TOF MS.

Com o objetivo de verificar a precisão na identificação dos isolados de *Salmonella* obtidos nos meios seletivos e diferenciais por MALDI-TOF MS em relação à metodologia de referência, foram avaliados os resultados obtidos de colônias (típicas, atípicas ou na ausência dessas, as colônias predominantes) selecionadas das amostras em diferentes meios de cultura nas concentrações testadas.

Nas metodologias (BAM/FDA, 2018) (M1) e identificação por MALDI-TOF MS (M2) foram obtidos 72 isolados em cada concentração testada (C0, C1 e C2) (n=216). Foram recuperados 82% (59/72) e 88% (63/72) de isolados positivos de *Salmonella* sp. nas concentrações C1 e C2, enquanto que na amostra controle (C0), foram detectados três isolados positivos (4%) (3/72) provenientes da amostra. Do total dos isolados positivos obtidos (n=125), 99% foram identificados positivos em ambos os métodos, indicando uma alta precisão na identificação.

Nas metodologias M3 e M4 propostas, foram obtidos 36 isolados em cada concentração testada (C0, C1 e C2) (n=108). Nas concentrações C1 e C2, foram recuperados 94% (34/36) de isolados positivos de *Salmonella* sp. em ambas metodologias, enquanto que na amostra controle (C0), não foram detectadas amostras positivas (Tabela 3).

É importante ressaltar que nos métodos M3 e M4 foi suprimida a etapa de enriquecimento seletivo que objetiva a inibição da microbiota acompanhante, esse fato possivelmente dificultou a detecção de *Salmonella* sp. nas amostras onde não houve contaminação intencional (C0). Verificou-se que em concentrações >10 UFC/g de *Salmonella* sp. os métodos testados apresentaram alta sensibilidade.

A etapa de pré-enriquecimento objetiva a recuperação das células que possam estar injuriadas no alimento. Entretanto, somente essa etapa não foi suficiente para recuperar *Salmonella* sp. que poderia estar presente em concentrações reduzidas.

Sparbier et al. (2012), objetivando a detecção de *Salmonella* sp. em amostras clínicas, combinando caldos de enriquecimento seletivo e MALDI-TOF MS, verificaram que houve maior identificação de *Salmonella* sp. quando foi usado a inoculação em caldo de enriquecimento seletivo, posterior isolamento em Ágar e identificação em MALDI-TOF MS, enquanto que quando estriadas diretamente no Ágar seletivo foram detectados índices de positividade menores.

O fabricante do MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) estabelece limites de escores para garantir a confiabilidade dos resultados. Os escores de identificação de *Salmonella* sp. obtidos variaram de 2.018 a 2.475, indicando a segurança da identificação dos isolados em nível de gênero para todos. Além disso, escores maiores que 2.300 possuem alta probabilidade de identificação de espécie. Assim, 43% (83/193) dos escores que variaram de 2.300 a 2.475 obtidos no experimento sugerem que os isolados possuem alta probabilidade de pertencer a espécie *S.*

enterica.

Tabela 3: Isolados positivos e negativos obtidos nos métodos M1, M2, M3 e M4 testados.

Amostra		M1 (n=216)		M2 (n=216)		M3 (n=108)		M4 (n=108)	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	2	4	2	4	3	0	3	0
	C2	4	2	3	3	1	2	1	2
2	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
3	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	1	2	1	2
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
4	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	3	3	3	3	3	0	3	0
	C2	4	2	5	1	3	0	3	0
5	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
6	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
7	C0	3	3	3	3	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
8	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	6	0	6	0	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
9	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	5	1	5	1	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
10	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	5	1	5	1	3	0	3	0
	C2	6	0	6	0	3	0	3	0
11	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	4	2	4	2	3	0	3	0
	C2	3	3	3	3	3	0	3	0
12	C0	0	6	0	6	0	3	0	3
	C1	4	2	4	2	3	0	3	0
	C2	4	2	4	2	3	0	3	0
Total		125	91	125	91	68	40	68	40
Total C0		3(4%)	69(96%)	3(4%)	69(96%)	0	36(100%)	0	36(100%)
Total C1		59(82%)	13(18%)	59(82%)	13(18%)	34(94%)	2(6%)	34(94%)	2(6%)
Total C2		63(88%)	9(12%)	63(88%)	9(12%)	34(94%)	2(6%)	34(94%)	2(6%)

Na amostra número sete, onde se identificou a presença de *Salmonella* na amostra controle (C0), os escores obtidos nos 3 isolados positivos foram 2.246, 2.305 e 2.320, sendo identificados por MALDI-TOF MS como *Salmonella* sp. Choleraesuis. Os scores 2.320 e 2.305 (colônia isolada 165 e 167) indicam alta

probabilidade de pertencer a espécie *S. enterica* (Tabela 4).

Tabela 4: Identificação por MALDI-TOF MS dos isolados de linguiça de frango tipo frescal positivos para *Salmonella* sp. com $score \geq 2.300$.

Colônia isolada	score	Matched pattern	Colônia isolada	score	Matched pattern
8	2.318	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	147	2.345	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
13	2.323	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	151	2.31	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
20	2.442	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	158	2.385	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
22	2.339	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	160	2.336	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
23	2.308	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)	161	2.37	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
24	2.301	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	165	2.302	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
25	2.31	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	167	2.305	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
35	2.32	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	170	2.367	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
36	2.306	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	172	2.358	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
38	2.31	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	176	2.315	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
39	2.429	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	177	2.334	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
40	2.316	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	184	2.394	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
41	2.475	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	201	2.332	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
42	2.386	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	205	2.434	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
51	2.308	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	206	2.421	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
53	2.348	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	207	2.315	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
54	2.472	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	212	2.32	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
62	2.303	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	226	2.337	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
63	2.417	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	230	2.368	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
65	2.305	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	234	2.346	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
66	2.377	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	238	2.417	<i>Salmonella</i> sp. (st. Dublin)
67	2.425	<i>Salmonella</i> sp. (st. Dublin)	251	2.358	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
68	2.437	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	254	2.309	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
70	2.425	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	257	2.344	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
71	2.3	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	259	2.323	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
72	2.405	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	267	2.309	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
77	2.369	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	268	2.387	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
79	2.344	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	269	2.319	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
80	2.359	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	270	2.319	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
81	2.37	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	282	2.406	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)
94	2.344	<i>Salmonella</i> sp. (st. Hadar)	288	2.363	<i>Salmonella</i> sp. (st. Dublin)
95	2.348	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	292	2.361	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
103	2.32	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	305	2.364	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
106	2.338	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	307	2.391	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)
108	2.348	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	308	2.399	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
117	2.306	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	310	2.31	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
122	2.314	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	319	2.359	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
126	2.377	<i>Salmonella</i> sp. (Enteritidis)	320	2.364	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
132	2.325	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	321	2.324	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
135	2.309	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)	322	2.35	<i>Salmonella</i> sp. (Choleraesuis)
144	2.325	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)	323	2.33	<i>Salmonella</i> sp. enterica (st Anatum)
146	2.414	<i>Salmonella</i> sp. (st Diarizonae)			

Dos isolados identificados por MALDI-TOF MS como alta probabilidade de pertencer a espécie enterica (83/193), 28 foram identificados como *Salmonella* sp. (enterica St. Anatum), 25 como *Salmonella* sp. (Choleraesuis), 18 como *Salmonella* sp. (Enteritidis), 8 como *Salmonella* sp. (enterica St. Hadar), 3 como

Salmonella sp. (enterica St. Dublin) e 1 como *Salmonella* sp. (enterica St. Diarizonae) (Figura 11). Apesar do sorotipo usado no presente estudo ser o Typhimurium, o banco de dados do equipamento utilizado não foi suficiente para se obter identificação específica desse sorotipo. No entanto, é preciso considerar que pode haver baixa habilidade discriminatória do sorotipo Typhimurium com os demais sorotipos de *Salmonella*, conforme descrito anteriormente por Kang e colaboradores (2017).

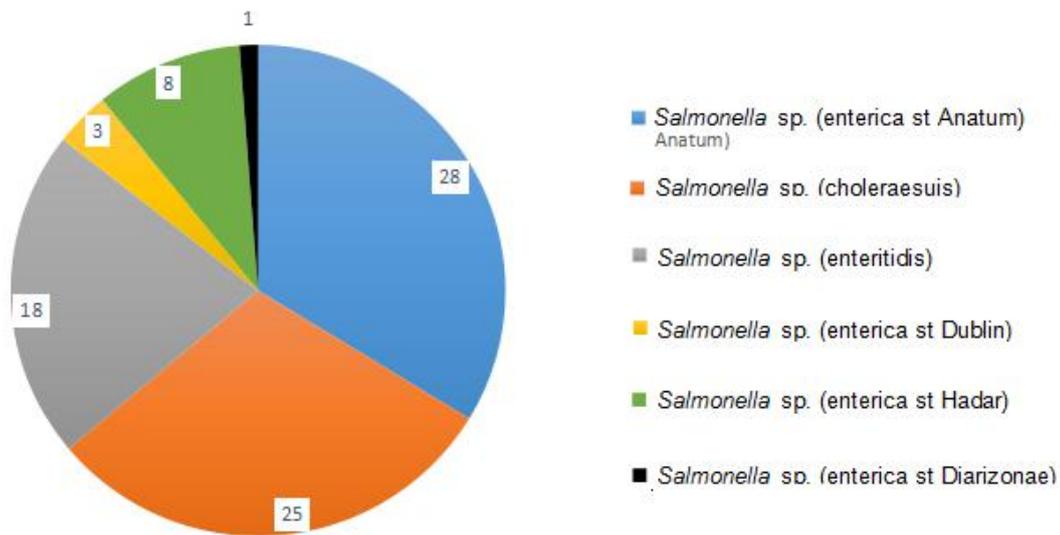


Figura 11: Identificação em MALDI-TOF MS de isolados de *Salmonella* com alta probabilidade de identificação de espécie.

A identificação de micro-organismos por MALDI-TOF MS apresentou resultados com escores de qualidade, reforçando a eficácia da técnica.

A tabela 5 mostra o índice de confiabilidade de todos os micro-organismos identificados nas amostras de linguiça de frango tipo frescal. Nota-se que houve uma boa identificação (escores entre 2.000 e 3.000) em 99% (n=323) dos isolados e 58% (n=188) demonstraram alta probabilidade de identificação de espécie.

A sensibilidade do método MALDI-TOF MS aplicado na análise de *Salmonella* se restringiu à detecção em nível de gênero, mas estudos mostram um alto potencial para detecção em nível de espécie. A razão disto parece estar no fato de que, como os espectros gerados se baseiam principalmente em proteínas ribossomais, a técnica MALDI-TOF MS apresenta limitações na diferenciação de espécies intimamente relacionadas como *Salmonella* (BILECEN et al., 2015).

Além disso, de acordo com Cheng et al. (2014), a leitura obtida na técnica MALDI-TOF MS não é ideal devido à baixa eficiência dos bancos de dados que não são completos abrangendo uma ampla gama de sorotipos de *Salmonella*, assim, a construção de um banco de dados mais completos, poderia permitir maior eficiência na identificação (CHERKAOUI et al., 2010; CHENG et al., 2014; BELL et al., 2016).

Bier et al. (2017) avaliaram a sensibilidade do método MALDI-TOF MS na detecção de *Salmonella* sp. e *E. coli* em carcaças bovinas obtendo precisão na identificação dos micro-organismos por este método. Nesse estudo os autores utilizaram cepas padrão ATCC como controle positivo e todas as identificações foram corretas.

Tabela 5: Confiabilidade das identificações por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) dos isolados de linguiça de frango tipo frescal.

Micro-organismo	Alta probabilidade de espécie	Identificação segura de gênero e provável identificação de espécie	Identificação provável de gênero	Identificação não confiável	Total
	≥ 2300 a ≤ 3000	≥ 2000 a ≤ 2299	≥ 1700 a < 2000	< 1700	
<i>Salmonella</i> sp.	83 (43%)	110 (57%)			193
<i>Citrobacter braakii</i>	4 (67%)	2 (33%)			6
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (33%)	2 (67%)			3
<i>Enterobacter asburiae</i>	2 (25%)	6 (75%)			8
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (38%)	5 (62%)			8
<i>Enterobacter kobei</i>		2 (100%)			2
<i>Escherichia coli</i>	24 (89%)	3 (11%)			27
<i>Escherichia fergusonii</i>	1 (100%)	0			1
<i>Hafnia alvei</i>	23 (95,8%)	1 (4,2%)			24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 (86%)	1 (14%)			7
<i>Klebsiella variicola</i>	1(100%)				1
<i>Morganella morganii</i>	1 (33%)	2 (67%)			3
<i>Proteus mirabilis</i>	39 (97,5%)	1 (2,5%)			40
<i>Providencia alcalifaciens</i>			1 (100%)		1
Total	188	135	1		324

Outros autores como Kang et al. (2017), avaliando a acurácia na identificação de *Salmonella* por MALDI-TOF MS Biotyper, mostraram alta precisão, de 98% e 95% na identificação dos isolados em nível de gênero e espécie, respectivamente. No entanto, quando avaliada a identificação de sorotipo pelo

software Biotyper, o método não se apresentou satisfatório. Esses autores verificaram que os espectros de massa de alguns sorotipos são tão semelhantes que a técnica não é capaz de identificar picos específicos que podem ser exclusivos de um sorotipo. Uma hipótese levantada por Kang e seus colaboradores é que a criação de algoritmos adequados pode levar a identificação de diferentes níveis taxonômicos (KANG et al., 2017).

Faron et al. (2015), utilizando a mesma técnica (MALDI Biotyper) na identificação de 2.263 isolados bacterianos aeróbios Gram negativos de diferentes fontes, incluindo 23 gêneros e 61 espécies, encontraram identificação precisa de 99,8% para gênero e 98,2% para espécie, quando comparados ao sequenciamento de DNA e testes bioquímicos.

Kuhns et al. (2012) avaliaram a capacidade da metodologia MALDI-TOF MS Biotyper discriminar o sorotipo Typhi de outros sorotipos através da identificação por células inteiras. Estes autores verificaram que houve a distinção de *Salmonella* de outros membros da família *Enterobacteriaceae* em 100% dos isolados. Além disso, foi realizada uma análise detalhada dos espectros e observou-se a identificação de muitos biomarcadores específicos para sorotipos, permitindo a distinção do sorotipo Typhi dos demais.

A metodologia 2 apresentou 100% de semelhança em relação a metodologia de referência (Kappa = 1), mostrando que a identificação de *Salmonella* sp. por MALDI-TOF MS apresentou-se eficiente quando aplicada em substituição aos testes bioquímicos e sorológicos confirmativos.

Ao comparar os métodos testados em relação à metodologia de referência, considerando todos os resultados positivos e negativos, os métodos M3 e M4 não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,3173$).

O grau de concordância de Kappa comparando os métodos 3 e 4 com a metodologia de referência foi igual a 0,9362, sendo considerada uma concordância perfeita (0,81 - 1,00), segundo Landis e Koch (1977).

Os resultados de sensibilidade relativa, especificidade relativa a acurácia relativa obtidos na comparação dos métodos estão descritos na Tabela 6.

Verificou-se que quando comparados os métodos M2 com a metodologia de referência (M1), todas as concentrações testadas apresentaram 100% de sensibilidade relativa e acurácia relativa.

Quando comparada a metodologia M3 e M4 com a metodologia de

referência, foi obtido 100% de sensibilidade relativa nas concentrações (C1) e (C2) e 100% de especificidade relativa na amostra controle (C0). A acurácia relativa verificada foi de 91,66% para (C0) e 100% para as concentrações (C1) e (C2).

Os parâmetros de sensibilidade relativa, especificidade relativa, e acurácia relativa verificados na comparação dos métodos foram altos. Outros autores compararam métodos de referência na detecção de *Salmonella* com métodos alternativos (ISO 6579 e PCR BAX System) e encontraram sensibilidade relativa, especificidade relativa e acurácia relativa de 81,40%, 85,61% e 84,89%, respectivamente (FRANCHIN, 2008).

Tabela 6: Sensibilidade relativa, especificidade relativa e acurácia relativa dos métodos (M2), (M3) e (M4) em relação à metodologia referência (M1).

Métodos	Concentrações	Sensibilidade relativa (%)	Especificidade relativa (%)	Acurácia relativa (%)
M2 x M1	0	100	100	100
	10	100	-	100
	1000	100	-	100
M3 x M1	0	-	100	91,66
	10	100	-	100
	1000	100	-	100
M4 x M1	0	-	100	91,66
	10	100	-	100
	1000	100	-	100

As técnicas propostas baseadas em identificação por MALDI-TOF MS também possibilitaram a identificação de isolados com perfis bioquímicos não compatíveis com *Salmonella* sp.. Nas amostras controle foram encontrados 130 isolados bacterianos que foram identificados como: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *E. fergusonii*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter braakii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *E. asburiae*, *E. kobei*, *Providencia alcalifaciens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *K. variicola* (Tabela 7). Desses, o *P. mirabilis* e *C. freundii* apresentaram colônias com características nos meios seletivos e diferenciais, bem como no LIA E TSI, sugestivas de *Salmonella* sp..

Todos os micro-organismos encontrados na linguiça de frango pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Mesmo não havendo controle estabelecido pela legislação brasileira atual em vigor, a detecção de outros gêneros e/ou espécies bacterianas no alimento, tais como a *E. coli*, é importante para se conhecer a microbiota presente no alimento e esclarecer possíveis fontes de contaminação. Desta forma, evitaria-se que outros micro-organismos com potencial patogênico, que

estejam porventura presentes, causem danos à saúde dos consumidores. É importante salientar que há uma nova revisão da RDC nº 12/2001, que estava em consulta pública em 2018, onde se propõe a inclusão da enumeração de *E. coli* e *Enterobacteriaceae* para alguns alimentos (ANVISA, 2018).

Tabela 7: Micro-organismos identificados por MALDI-TOF MS nas amostras de linguiça de frango tipo frescal sem contaminação intencional (controle).

Amostras	Micro-organismos identificados
1	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i>
2	<i>Citrobacter braakii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> ,
3	<i>Hafnia alvei</i>
4	<i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
5	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i>
6	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Hafnia alvei</i>
7	<i>Salmonella</i> sp. <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia fergusonii</i> , <i>Providencia alcalifaciens</i>
8	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>E. kobei</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
10	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Enterobacter asburiae</i>
11	<i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Citrobacter braakii</i>
12	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , <i>Hafnia alvei</i>

Gwida et al. (2014) verificaram a presença de *Enterobacteriaceae* em carne de frango crua pelo método MALDI-TOF MS e identificaram a presença de *P. mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. (com maior prevalência da espécie *K. pneumoniae*), *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Raoultella* sp. e *Citrobacter freundii*. Esses autores relataram alto índice de isolados de *Proteus* nas amostras de carne de frango (78%) que pode estar relacionado a falta de higiene no processamento dos alimentos. Na linguiça de frango tipo frescal avaliada no presente estudo foi identificada microbiota semelhante à encontrada por Gwida e seus colaboradores em carne de frango, podendo sugerir que a contaminação microbiana pode ser proveniente da matéria prima.

Estudos no Brasil mostram que bactérias da família *Enterobacteriaceae* como *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp. e *Klebsiella pneumoniae* foram isoladas de insetos (*Alphitobius diaperinus*) e cama aviária em granjas de produção de frango no sul do país (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). Segabinazi et al. (2005) verificaram que dentre as enterobactérias encontradas no inseto (*A. diaperinus*) oriundo de granjas avícolas, as mais frequentemente

encontradas foram *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, além de outros gêneros como *Salmonella*, em menor frequência. Esse inseto pode funcionar como reservatório e veicular patógenos para os frangos de corte nas granjas. *Salmonella* possui como principal *habitat* o trato intestinal de humanos e animais, podendo ocasionalmente colonizar os insetos (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002).

As metodologias de referência usadas atualmente são baseadas em características bioquímicas e fisiológicas (como alteração de cor do meio de cultura, produção de gás pela fermentação de carboidratos) e sorológicas (como aglutinação). Essas características muitas vezes aparecem de forma subjetiva, impossibilitando a confirmação dos resultados de forma rápida e precisa. Além disso, *Salmonella* muitas vezes pode apresentar mutações e variações bioquímicas que podem alterar a sensibilidade e especificidade do método testado (DICKEL et al., 2005).

Alguns micro-organismos podem apresentar características de crescimento em meios seletivos e diferenciais muito semelhantes com *Salmonella* sp., como é o caso do *Citrobacter freundii* no agar XLD (SPARBIER et al., 2012, KUHNS et al., 2012), o que pode apresentar um desafio para os analistas. Esse micro-organismo foi identificado por MALDI-TOF MS nas amostras de linguiça de frango tipo frescal do presente estudo. Outro micro-organismo cuja diferenciação de *Salmonella* sp. foi difícil nos meios seletivos e diferenciais e identificação bioquímica no presente estudo foi o *Proteus mirabilis*. Quarenta isolados (40/324) foram identificados como *P. mirabilis* nas amostras de linguiça de frango tipo frescal, sendo que 58% deles foram identificados em amostras onde houve contaminação intencional por *Salmonella* Typhimurium. Destes, 100% apresentavam características típicas nos meios seletivos e diferenciais semelhantes à *Salmonella* sp., o que pode ter dificultado o isolamento desta bactéria nas amostras contaminadas intencionalmente. Isso pode impedir a obtenção de resultados mais rápidos, pois muitas vezes as análises precisam ser repetidas para confirmação de resultados. Além disso, as metodologias de referência dependentes de cultivo usadas atualmente são muito específicas para detecção de determinado micro-organismo. Portanto, quando substitui-se a etapa de identificação por leitura em MALDI-TOF MS há a identificação de muitos outros micro-organismos que muitas vezes passam despercebidos e podem também apresentar potencial patogênico.

O desenvolvimento de novos métodos para detecção de patógenos em alimentos é relevante, uma vez que atualmente há uma grande demanda por métodos rápidos que garantam a liberação para o comércio de lotes de alimentos seguros para o consumo e que alcancem o mesmo nível de sensibilidade que os métodos de referência.

Atualmente, muitas técnicas moleculares alternativas são utilizadas e bem estabelecidas para detecção de *Salmonella* com alta sensibilidade. Dentre elas destaca-se a PCR e qPCR. Entretanto, essas técnicas são complexas e necessitam de pessoal treinado para execução. Além disso, podem apresentar limites mínimos de detecção (aprox. 10^2 células) (BELL et al., 2016), e também podem não identificar espécies intimamente relacionadas (ALATOON et al., 2011), inviabilizando o uso das mesmas em laboratórios de rotina.

No método MALDI-TOF MS, escores são gerados a partir da medição da massa de proteínas, resultando na formação de uma impressão digital com características exclusivas a um determinado gênero ou espécie. Um ponto importante a ser considerado para uma boa identificação por MALDI-TOF MS é a presença dos gêneros e espécies na biblioteca de espectros referência. A eficiência do método na detecção de diversos micro-organismos tem sido comprovada pelos pesquisadores que argumentam ser um equipamento de fácil execução com leitura rápida sendo necessário em torno de 10 minutos desde seleção da colônia até a identificação. Destacam ainda que o preparo da amostra é simples, não necessitando de nenhum conhecimento aprofundado sobre o micro-organismo para realização da detecção (HO; REDDY, 2010; BELL et al., 2016).

Para a indústria, o tempo de espera até a liberação do laudo final de análise para posterior liberação do alimento para comercialização é muito desgastante, podendo gerar perdas econômicas para a empresa (FRANCHIN, 2008). E quanto maior esse período, maior o tempo para tomada de ações preventivas e corretivas em caso de qualidade insatisfatória. Pensando nisso, métodos rápidos e confiáveis para identificação de micro-organismos patogênicos, dentre eles *Salmonella*, são necessários para o controle do micro-organismo e a prevenção de doenças de origem alimentar (DIECKMANN et al., 2008).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango e a presença de *Salmonella* pode comprometer o comércio e exportação, principalmente com os países vinculados à União Europeia. Desta forma, justificam-

se estudos que busquem a criação de novos métodos de detecção rápidos e eficientes, deste e de outros patógenos de origem alimentar, que têm grande interesse para saúde pública.

Para a detecção de *Salmonella* sp. pelas metodologias propostas M2, M3 e M4 foram necessários cinco, oito e quatro dias para obtenção do resultado positivo, respectivamente. Esse tempo foi inferior ao necessário para execução da metodologia de referência proposta por (BAM/FDA, 2018) e outras também muito utilizadas como a (ISO 6579 2017) que variam de sete a nove dias. A redução do tempo de execução das análises é de grande importância quando se pensa em uma metodologia alternativa para detecção de *Salmonella* sp. em alimentos.

Além do tempo de análise e precisão da técnica, outro fator importante para a escolha da metodologia a ser empregada é o custo. Quando comparado com identificação pela metodologia de referência, a identificação por MALDI-TOF MS apresentou redução estimada de aproximadamente 70% no custo da análise. Essa redução é muito relevante, mas deve-se considerar que o custo inicial de obtenção do equipamento é alto quando comparado a outras metodologias de detecção.

Não foram encontrados dados na literatura sobre custo de análise por MALDI-TOF MS voltado para área de alimentos, mas SENG et al. (2009) compararam a identificação com outros métodos de detecção de micro-organismos em amostras clínicas e também observaram que a redução no custo das análises pode chegar a aproximadamente 70%. Apesar de serem metodologias diferentes, imagina-se que o custo de identificação é próximo, pois todas as identificações partem de uma colônia isolada e os reagentes utilizados no preparo da amostra são geralmente os mesmos. O custo seria diferente se fosse necessário a extração das proteínas antes da análise.

2. CONCLUSÃO

A indústria de carnes é um dos setores alimentícios que mais cresce no Brasil, o que requer um gasto crescente com análises para a garantia da qualidade microbiológica dos produtos cárneos comercializados. Esse cenário aumenta a demanda por métodos rápidos de detecção de micro-organismos patogênicos veiculados por esses alimentos, que possam ser tanto ou mais eficientes que os já existentes.

Os resultados deste estudo mostraram que a detecção de *Salmonella* sp. em linguiça de frango tipo frescal através da combinação de técnicas de cultivo e posterior identificação por MALDI-TOF MS proposta na metodologia 2 foi eficiente, apresentando alta precisão quando comparada a metodologia de referência. As metodologias M3 e M4 também foram eficientes, apresentando limite de detecção maior que 10 UFC/g.

Estatisticamente não foi observada diferença significativa entre as metodologias testadas, mas nas metodologias M3 e M4 a concentração de células deve estar acima de 10 UFC/g, para maior segurança dos resultados.

O uso da detecção por MALDI-TOF MS apresentou-se como uma ferramenta eficiente na detecção de *Salmonella* sp.. Os parâmetros de sensibilidade relativa, especificidade relativa, e acurácia relativa verificados na comparação dos métodos foram altos. Além de conferir precisão e rapidez na identificação do patógeno, o método também foi capaz de identificar outras espécies de micro-organismos presentes no alimento, que passaram despercebidas pela metodologia de referência.

As metodologias M2, M3 e M4 apresentaram redução no tempo de análise para cinco, oito e quatro dias em relação à metodologia de referência, na qual são necessários até nove dias para obtenção do resultado final. A redução do tempo de análise é muito importante quando se leva em conta que produtos de origem animal comercializados na forma fresca, como a linguiça de frango, possuem vida de prateleira reduzida.

Apesar de não constar como um dos objetivos, o custo da detecção também é importante quando se pensa em metodologias alternativas. Na metodologia (M2) o custo de análise foi baixo quando comparado com a metodologia de referência.

A identificação de *Salmonella* sp. por MALDI-TOF MS foi eficiente, mas é possível melhorar este cenário, uma vez que há expectativas de que os bancos de dados sejam cada vez mais atualizados, o que contribuirá para a ampliação dos níveis identificação deste e de outro patógenos.

Considerando a redução do tempo de análise e o limite de detecção estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001), que exige a ausência de *Salmonella* sp., entre os métodos testados, o método M2 apresenta-se como a mais eficiente ferramenta para o rastreamento desse micro-organismo.

3. REFERÊNCIAS

- ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2016**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 23/08/2017.
- ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Cenário carnes 2014/2015**. 2017, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/cenario-carnes-2014-2015.pdf/view>>. Acesso em: 09 de Maio de 2017.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, USA, v. 42, p. 198-207, 2003.
- ALATOOM, A. A.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Rochester, v.49, p. 2868-2873, 2011.
- ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A. A.; MEDEIROS, M. I. C.; RODRIGUES, D. dos P.; VARANI, A. de M.; LUO, Y.; ALLARD, M. W.; FALCAO, J. P. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **Plos One**. Brasil, , Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201882>, 2018.
- ALVES, C. F. M. **Bactérias enteropatogênicas envolvidas em doenças transmitidas por alimentos e diarreias agudas em Minas Gerais no período de 2006 a 2008**. 2009. 82p. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG - 2009.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16s ribosomal DNA primers. **Poultry Science Rehovot**, Israel, v. 83, p. 1093-1098, 2004.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, Usa, 520179, 2015.
- ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Baltimore, v.47, n.2, p. 219-225, 1975.
- ANVISA, Agência De Vigilância Sanitária, (Brasil) **Consulta Pública nº 541 de 17/07/2018**. Proposta de revisão da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 2001, que dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=466>

0481&_101_type=document&inheritRedirect=false>. Acesso em: 15/09/2017. Brasília, 2018.

APHA, American Public Health Association. 2001. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed, Washington, Chapter 2, p.13-23. 2001.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. P. A E. Espectrometria de Massas aplicada na classificação e identificação de micro-organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

AVIMIG. Associação dos Avicultores de Minas Gerais (AVIMIG). 2017. Disponível em: <http://www.avimig.com.br/avicultura.php#.XGrFOaBv-UI>. Acesso em: 18/02/2019.

AZIZ, D. A. E. Detection of *Salmonella* Typhimurium in retail chicken meat and chicken giblets. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Egito, v. 3, n. 9, p. 678-681, 2013.

BARANCELLI, G.V.; MARTIN, J. G. P.; PORTO, E. *Salmonella* em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2012.

BELL, R. L.; JARVIS, K. G.; OTTESEN, A. R.; MCFARLAND, A. A.; BROWN, E. W.; Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. **Microbial Biotechnology**, USA, v. 9, p. 279–292, 2016.

BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T. N.; OLIVEIRA, T. L.; ARAÚJO, F. R.; VERBISCK, N. V. Identificação por Espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Campo Grande, V. 37. n. 12, p. 1373-1379, 2017.

BILECEN, K.; YAMAN, G.; CIFTCI, U.; AND LALELI, Y. R. Performances and reliability of bruker microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for the identification of clinical microorganisms. **BioMed Research International**. Turquia, 516410, 2015.

BISWAS, S.; ROLAIN, J.M. Use of MALDI-TOF MS mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **Journal of Microbiological Methods**, França, v. 92, p. 14-24, 2013.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, Suíça, v.16, n.11, p. 1614-1619, 2010.

BRADEN, C. R. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Atlanta, v.43, n. 4, p. 512-17, 2006.

SÃO PAULO, Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Cordenadoria de Defesa

Agropecuária. Governo do estado de São Paulo. **Portaria nº 8, de 23 de janeiro de 1995**. Método Analítico de Carcaça de Aves e Pesquisa de Salmonella, São Paulo, 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa. Resolução - **RDC. N 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, Brasília. 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 20 de 21 de outubro de 2016**. Dispõe sobre o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). 2016.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Atlanta, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CABRAL, C. C.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niteroi and Rio de Janeiro, **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 9, p. 243–249, 2014.

CAMPOS, L.C. 2008. *Salmonella*. In: Trabulsi L.R.; Alterthum, F., **Microbiologia**. São Paulo. Atheneu, 2005. p. 319-328.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p. 1465-1468, 2005.

CAPALONGA, R.; RAMOS, R. C.; BOTH, J. M. C.; SOEIRO, M. L. T.; LONGARAY, S. M.; HASS, S.; TONDO, E. C. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **Journal of Infection in Developing Countries**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 7, p. 811-817, 2014.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Summary**, 2009. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/Salmonella-annual-summary-2009-508c.pdf>>. Acesso em: 15/07/2018.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States**. 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated413.pdf>. Acesso em 21 de março de 2017.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report)**. 2014. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and

Human Services. Disponível em: < https://www.cdc.gov/foodnet/pdfs/2012annual_report_508c.pdf>. Acesso em: 03/09/2018.

CHENG, K.; SLOAN, A.; MEAKIN, J.; MCCORRISTER, S.; JEROME, M.; WESTMACOTT, G.; DREBOT, M.; NADON, C.; KNOX, D.; WANG, G. Sequence-level and dual-phase identification of *Salmonella* flagellum antigens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LCMS/MS). **Journal of Clinical Microbiology**, Canadá, v. 52, N.6, P. 2189- 2192, 2014.

CHENG, K.; CHUI, H.; DOMISH, L.; HERNANDEZ, D.; WANG, G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. **Proteomics Clinical Applications**, Canada, v.10, p. 346-357. 2016.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S.; TANGOMO, M.; GIRARD, M.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. **Journal of Clinical Microbiology**, Suíça, v. 48, n. 4, p. 1169-1175, 2010.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Curitiba, v.4, n.3, p. 243-247, 2002.

CLARK, A. E.; KALETA, E. J.; ARORA, A.; WOLK, D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, USA, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

COELHO, L. R. **Equivalência de métodos alternativos ao oficial para determinação de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium em amostras ambientais avícolas**. 2012. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Faculdade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG. 2012.

CONWAY, G. C.; SMOLE, S. C.; SARRACINO, D. A.; ARBEIT, R. D.; LEOPOLD, P. E. 20. Phyloproteomics: species identification of *Enterobacteriaceae* using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, USA, v. 3, p.103-112, 2001.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; BRESLIN, M. F.; DAVIES R. H. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 92, p. 424-432, 2002.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF MS mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, Suíça, v. 36, p. 380-407, 2012.

CRUMP, J.A.; LUBY, S.P.; MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. Bulletin of the World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization, **Bulletin of the World Health Organization**, Atlanta, v. 82, n. 5, p. 346-353, 2004.

DIANIN, K. C. S. **Indicadores de higiene e pesquisa de *Salmonella* spp. em linha de abate e processamento de frango de corte**. 2016. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Setor Palotina, Pós Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2016.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILOTTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, V. V.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, Rio Grande do Sul, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

DIECKMANN, R.; HELMUTH, R.; ERHARD, M.; MALORNY, B. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Alemanha, v. 74, p. 7767-7778, 2008.

DIECKMANN, R.; STRAUNCH, E.; ALTER, T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF MS mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Alemanha, v. 109, p. 199-211, 2010.

DIECKMANN, R.; MALORNY, B. Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Alemanha, v. 77, n. 2, P. 4136-4146. 2011.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY **The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007**. 350p. 2009. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-223>>. Acesso em: 21/08/2017.

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013**. EFSA Journal. v. 13, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3991>> Acesso em 22/08/2017.

FARON, M. L.; BUCHAN, B. W.; HYKE, J.; MADISEN, N.; LILLIE, J. L.; GRANATO, P. A.; WILSON, D. A.; PROCOP, G. W.; NOVAK-WEEKLEY, S.; MARLOWE, E.; CUMPIO, J.; GRIEGO-FULLBRIGHT, C.; KINDIG, S.; TIMM, K.; YOUNG, S.; LEDEBOER, N. A. Multicenter evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA system for the identification of clinical aerobic gram-negative bacterial isolates. **PLoS One**, USA, v. 10, n. 11, e0141350, 2015.

FAÚLA, L. L.; SOARES, A. C. C.; DIAS, R. S. Panorama dos surtos de doenças de

transmissão alimentar (DTA) ocorridos em Minas Gerais, Brasil no período de 2010 a 2014. Gerais: **Revista da Saúde Pública do Sus/MG**, v.3, n. 1, 2014.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Chapter 5. Salmonella**. 2018. Bacteriological Analytical Manual - BAM/FDA. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>. Acesso em: 19/01/2017. 22p.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bad Bug Book Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm297627.pdf>. Acesso em: 15/08/2018.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **New test system identifies 193 different yeasts and bacteria known to cause illness**. 2013a. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm365907.htm>. Acesso em: 27/03/2017.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **News Release, Bruker Gets 510(k) OK for MALDI Biotyper**. 2013b. Disponível em: <http://www.fdanews.com/articles/160734-bruker-gets-510k-ok-for-maldibiotyper>. Acesso em: 15/08/2018.

FEARNLEY, E.; RAUPACH, J.; LAGALA, F.; CAMERON, S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, Austrália, v. 146, p. 219-227, 2011.

FRANCHIN, P. R. **Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos**. 2008. 103p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina - SC. 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. micro-organismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Ateneu, p. 33-81, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Barueri: Manole, 4.ed., 1034p, 2011.

GIEBEL, R.; WORDEN, C.; RUST, S.M.; KLEINHEINZ, G.T.; ROBBINS, M.; SANDRIN, T.R. Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. In: LASKIN, A.; GEOFFREY, G.; SARIASLANI, S. **Advances in Applied Microbiology**. USA, Elsevier, p. 149-184, 2010.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Instituto Pasteur, Paris, França, 9th edition, 2007.

GWIDA, M.; HELMUT, H.; GEUE, L.; TOMASO, H. Occurrence of *Enterobacteriaceae* in Raw Meat and in Human Samples from Egyptian Retail Sellers. **International Scholarly Research Notices**, Egito, 2014,565671, 2014.

HASSANEIN, R.; ALI, S. F. H.; EL MALEK, A. M. A. M.; M. A.; ELSAYH, K. I. Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. **Veterinary World**, Egito, V.4 , N. 1, P. 5-11, 2011.

HETTICK, J. M.; KASHON, M. L.; SLAVEN, J. E.; MA, Y.; SIMPSON, J. P.; SIEGEL, P. D.; MAZUREK, G. N.; D. N. WEISSMAN, D. N. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. **Proteomics**, USA, v. 6, p. 6416-6425, 2006.

HO, Y. P.; REDDY, M. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. **Mass spectrometry Reviews**, Taiwan, v.30, p. 1203-1224, 2010.

ISO, International Standard Organization 16140, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, 2003.

ISO, International Standard Organization 6579-1:2017. Microbiology of food chain: Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. 60p. 2017.

JACKSON, B. R.; GRIFFIN, P. M.; COLE, D.; WALSH, K. A.; CHAI, S. J. Outbreak-associated *Salmonella* enterica Serotypes and Food Commodities, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 19, n. 8, p.1239-1244, 2013.

KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Serovars of *Salmonella* spp Isolated from Broiler Chickens and Commercial Breeders in Diverse Regions in Brazil from July 1997 to December 2004 . **Brazilian Journal of Poultry Science**, São Paulo, v. n.3, p.195-198, 2005.

KANG, L.; LI, N.; LI, P.; ZHOU, Y.; GAO, H., XIN, W.; WANG, J. MALDI-TOF mass spectrometry provides high accuracy in identification of *Salmonella* at species level but is limited to type or subtype *Salmonella* serovars. **European Journal of Mass spectrometry**, China, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2017.

KUHNS, M.; ZAUTNER, A. E.; RABSCH, W.; ZIMMERMANN, O.; WEIG, M.; BADER, O.; GROB, U. Rapid discrimination of *Salmonella* enterica serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF (MS) mass spectrometry. **PLoS One**, Alemanha, v.7, n.6, e40004, 2012.

KUSHIDA, M. M. **Validação de métodos laboratoriais: Avaliação do sistema BAX de análise de *Salmonella* sp. em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR)**. 2005. 166 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 2005.

LANDIS, J. R.; G. G. KOCH. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Usa, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LAZARO, N. dos S.; REIS, E. M. F.; PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, D. P. **Gênero *Salmonella*: Características epidemiológicas e laboratoriais**. Laboratório de Referência de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas – Laboratório de Enterobactérias. LRNCEB. LABENT.IOC/VPRSA/FIOCRUZ. 67p. Outubro de 2008. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSIONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/Manual%20Salmonella%20GSS%202008%20doc..pdf>. Acesso em: 23/08/2017.

LAW, J. W. F.; MUTALIB, N. S. A.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in Microbiology**, Malasia, v. 5, p. 1-19, 2015.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.4, p.465-468. 1987.

MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKEYA, A. D.; DRAKE, R. R.; MANCINELLI, L.; MOUSSAOUI, W.; PREVOST, G.; PUTIGNANI, L.; SEACHORD, C.L.; TANG, Y. W.; HARMSEN, D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry based species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Alemanha, v. 47, n. 11, p. 3732-3734, 2009.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico. v. 5, n, 6, 2005. 7p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano05_n06.pdf>. Acesso em: 23/08/2017.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. Brasília, 60p. 2011. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-Salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 25/08/2017.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2018. 15p. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>>. Acesso em: 15/08/2018.

MURRAY, P.R. What is new in clinical microbiology - Microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. **Journal of Molecular Diagnostics**, Nova York, v. 14, n. 5, p. 419-423, 2012.

OIE, WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Salmonellosis. Terrestrial Manual 2016**. Chapter 2.9.8. PARIS. 2016. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf>. Acesso em: 28 de julho de 2017.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology, **Clinical Infectious Diseases**, Alemanha, v.57, p. 564-572, 2013.

PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; KONRAD, R.; BUSCH, U. Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. **The Open Microbiology Journal**, Alemanha, v. 7, p. 135-141, 2013.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, França, v. 152, p. 907-909, 2001.

PROBAC DO BRASIL. Soros polivalentes Anti-*Salmonella*. Disponível em: <<http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Soros/Soros%20Polivalente%20Anti-Salmonella%20Rev%2002.pdf>>. Acesso em:15/08/2018.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; da SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAUJO JUNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; HEIBA, A. A.; PLIKAYTIS, B. D.; FARMER J.J. Clonal Nature of *Salmonella typhi* and Its Genetic Relatedness to other *Salmonellae* as shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, Egito, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

RODRIGUES, N. M., BRONZATO, G. F., SANTIAGO, G. S., BOTELHO, L. A., MOREIRA, B. M., COELHO, I. D., SOUZA, M.,M.; COELHO, S. M. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification *versus* biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p.132-138. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.025>, 2017.

SAFFERT, R. T.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; MONSON JOBE, K. E.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of bruker biotyper maldi-tof mass spectrometer to bd phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. **Jornal of Clinical Microbiology**, USA, v.49, p. 887- 892, 2011.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada á experimentação animal**. 4. ed. Belo Horizonte, 265 p. 2015.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bactéria. **Nature**, Alemanha, v. 8, p. 74-82, 2010.

SES, SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE. Centro de Vigilância Epidemiológica, **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos (DTAs) notificados a DDTHA/CVE**, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-devigilancia/doenc>>

as-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/dados-estatisticos/surtos-de-dtas/surtos-dta>
Acesso em: 23/08/2017.

SEGABINAZI, S. D.; FLORES, M. L.; BARCELOS, A. S.; JACOBSEN, G.; ELTZ R. D. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, p. 51-55, 2005.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; AND VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology India**, v. 6, p.791, 2015.

SCHAUMANN, R.; KNOOP, N.; GENZEL, G. H.; LOSENSKY, K.; ROSENKRANZ, C.; STINGUI, C. S.; SCHELLENBERGER, W.; RODLOFF, A. C.; ESCHRICH, K. Discrimination of *Enterobacteriaceae* and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass spectrometry. **The Open Microbiology Journal**, Alemanha. v. 7, p.118-122, 2013.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.E.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, França, v. 49, p. 543-51, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo, Editora Varela, p. 287-320, 2010.

SPARBIER, K.; WELLER, U.; BOOGEN, C.; KOSTRZEWA, M. Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, Alemanha, v. 31, p. 767-773. 2012.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and Polymer Analyses up to *m/z* 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight. **Rapid Communications in Mass spectrometry**, Japão, v.2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G.M.; EUZEBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Alemanha, v. 55, p. 521-524, 2005.

TOMAS, D.; RODRIGO, A.; HERNANDEZ, M.; FERRUS, M.A. Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in Chicken Feces Samples. **Food Analytical Methods**, Espanha, v.2, p. 180-189, 2009.

TRUPER, H. G. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet enterica in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55, 519–520. 2005.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNANRD, S.; CASADESUS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, Itália, v. 125, p.229-255, 2000.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C. J.; KUIJPER, ED J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, Reino Unido, v. 48, p. 900-907, 2010.

WELKER, M.; MOORE, E, R, B. Applications of whole-cell matrix assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. **Systematic and Applied Microbiology**, Alemanha, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2011.

WOLFFS, P. F. G.; GLENCROSS, K.; THIBAUDEAU, R.; GRIFFITHS, M. W. Direct Quantitation and Detection of *Salmonellae* in Biological Samples without Enrichment, Using Two-Step Filtration and Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Reino Unido, v.17, n. 6, p. 3896-3900, 2006.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella (non- typhoidal)**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 11/05/2017.

ZHAO, X.; LIN, C. H.; WANG, J.; OH, D.H. Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. **Jornal of Microbiology and Biotechnology**, China, v. 24, n. 3, p. 297–312, 2014.

