

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DESCRITOS PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP EM AMOSTRAS DE CACAU E CHOCOLATE E SUA IMPORTÂNCIA NA SEGURANÇA DE ALIMENTOS

FERNANDES, Fernanda Gomes; QUEIROZ, Maria Cristina Ricci; CAPUANO, Verena
gomesferfernandes@gmail.com

Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz

Resumo: *A Salmonella é o maior agente causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Com mais de 2500 sorotipos conhecidos, está presente no trato gastrointestinal do homem e animais, sendo as aves o principal reservatório. Além dos fatores inerentes ao alimento, a contaminação cruzada é um importante fator na contaminação dos alimentos por esse patógeno. Esse microrganismo possui mecanismos para sobrevivência em alimentos, podendo permanecer sob condições de estresse, como em amostras de cacau e produtos de chocolate por mais de 9 meses. Com mecanismo de patogenicidade por invasão tecidual, a Salmonella pode ter um período de incubação de até 14 dias e em alguns casos agravamento do quadro, com diarreia sanguinolenta, sendo necessária internação hospitalar. A detecção desse patógeno nos alimentos, seja pelo método tradicional ou métodos alternativos validados por órgãos certificadores, como a AOAC International, com a obtenção de resultados rápidos e precisos na análise microbiológica são fundamentais na garantia da segurança de alimentos e saúde do consumidor final.*

Palavras-chave: *Salmonella. Cacau. AOAC. Segurança de Alimentos. Detecção.*

Abstract: *Salmonella is the largest agent that causes foodborne illnesses. With more than 2500 known serotypes, it is present in the gastrointestinal tract of man and animals, poultry are the main reservoir. In addition to the factors inherent to food, cross-contamination is an important factor in food contamination by this pathogen. This microorganism has mechanisms for survival in food, may remain under stress conditions, as in cocoa samples and chocolate products for more than 9 months. With pathogenicity mechanism by tissue invasion, Salmonella may have an incubation period of up to 14 days and in some of the cases worsening of the condition, with a bloody diarrhea being necessary hospitalization. The detection of this pathogen in food, either by the traditional method or alternative methods validated by certifying bodies, such as AOAC International, with the achievement of fast and accurate results in the microbiological analysis are fundamental in ensuring food safety and health of the final consumer.*

Keywords: *Salmonella. Cocoa. AOAC. Food Safety. Detection.*

1 INTRODUÇÃO

A microbiologia de alimentos trata-se do estudo dos microrganismos e sua relação com os alimentos (BRINQUES, 2016).

A presença dos microrganismos e seu comportamento no alimento depende de diversos fatores. Existem microrganismos que podem ser naturais do alimento e, através do seu metabolismo, favorecer a apresentação desse, como por exemplo os fermentadores. E há os microrganismos indesejáveis ao alimento, sendo eles deteriorantes, que causam alterações sensoriais (cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento), ou patogênicos, que representam importante risco à saúde e normalmente estão associados a condições de higiene na produção (RIBEIRO, 2018).

Existem diversos microrganismos com potencial patogênico e que podem estar associados aos alimentos. A *Salmonella* é uma das bactérias mais conhecidas popularmente quando se trata desse tema.

Conforme Silveira *et al* (2019), Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são aquelas transmitidas através do consumo de alimentos contaminados por determinado patógeno (bactérias, fungos, vírus, por exemplo) ou produtos de seu metabolismo, como toxinas. E, de acordo com o CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (2022) quando duas ou mais pessoas possuem a mesma doença originada pelo mesmo alimento ou bebida, é considerado um surto de DTA.

A *Salmonella* é um microrganismo que compõe a microbiota do trato gastrointestinal do homem e de diferentes animais, sendo que o mais importante reservatório são as aves. Por esse motivo, pode ocorrer a contaminação cruzada com os alimentos caso não se tenha práticas higiênico-sanitárias rígidas na produção e manipulação dos alimentos (LUSTOSA *et al.*, 2021). Os principais alimentos envolvidos em contaminação por *Salmonella* spp são os ovos, alimentos à base de ovo, leite, carne bovina e de aves (FERRARI *et al.*, 2019).

A detecção de *Salmonella* em alimentos é uma exigência das autoridades sanitárias, que são regulamentadoras da segurança de alimentos na cadeia de produção. Cada país possui seu respectivo órgão regulamentador, assim como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), presentes no Brasil (MELO *et al.*, 2018).

Existem diversos métodos de análise microbiológica de alimentos descritos na literatura, conforme o microrganismo-alvo, tipo de matriz alimentar, intenção de análise e exigências dos órgãos. As metodologias recomendadas pela ANVISA e pelo MAPA para análise microbiológica de alimentos têm como referência os métodos oficiais descritos pela *American Public Health Association* (APHA), *Food and Drug Administration* (FDA), *Food Safety and Inspection Service of United States Department of Agriculture* (FSIS/USDA), *Association of Official Analytical Collaboration* (AOAC) *International* e *International Organization for Standardization* (ISO) (DA SILVA, 2017).

Esses métodos podem ser do tipo convencionais/tradicionais ou alternativos. De acordo com Da Silva (2017), dentre os métodos descritos para detecção de *Salmonella*, a técnica tradicional é de presença ou ausência desse patógeno na amostra. Isso se deve ao fato de a *Salmonella* não ser uma boa competidora em relação à microbiota e/ou baixa quantidade de células presentes no alimento e/ou células em estado injuriado devido aos procedimentos de preservação desse alimento, como congelamento, tratamento térmico e secagem, por exemplo.

Dentre as técnicas de análise microbiológica, a ISO 6579-1:2007 descreve o método horizontal para detecção de *Salmonella* spp para produtos de consumo humano e rações animais, amostras ambientais da área de produção e manipulação e amostras de produção primária, como *swabs* e fezes animais. Inicialmente realiza-se o pré-enriquecimento, seguido do enriquecimento seletivo, isolamento e confirmação bioquímica ou sorológica (ABNT NBR ISO6579-1:2021).

Segundo o EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (MELO *et al.*, 2018), os métodos tradicionais possuem diversas etapas e necessitam de dias até a conclusão final e liberação do resultado. Os métodos alternativos são denominados dessa forma, pois têm

como objetivo principal a redução no tempo de liberação do resultado e, conseqüentemente, no número de etapas necessárias para a análise. Esses métodos podem ser bioquímicos miniaturizados, imunológicos, moleculares e técnicas com combinações com cultura.

Ainda segundo o EMBRAPA (MELO *et al.*, 2018), dentre os métodos alternativos, os testes moleculares foram os que mais cresceram nos últimos anos. Os testes de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, também conhecido pela sigla qPCR, possuem como principais vantagens maior especificidade e sensibilidade, detecção mais rápida sem a necessidade de obter uma cultura pura e enriquecimento da amostra em menor tempo, quando comparados aos métodos tradicionais.

Esse trabalho visa analisar através da comparação os métodos de detecção de *Salmonella* spp convencionais e alternativos (testes moleculares) descritos para amostras de alimentos em geral e amostras de cacau e/ou produtos de chocolate, identificando as diferenças existentes de forma a correlacionar o tempo de liberação do resultado do teste com a segurança de alimentos.

2 SALMONELLA

Bacilo Gram-negativo, não produtor de esporos, anaeróbio facultativo e pertencente à família *Enterobacteriaceae*, de acordo com Da Silva (2017), essa bactéria possui duas espécies, diferentes subespécies e sorovares. A espécie *S. enterica* possui 260 sorovares e a *S. bongori* 23 sorovares. A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* são as de maior importância na saúde tanto humana quanto dos animais por afetarem ambos (MAPA, 2021).

Tendo como mecanismo de patogenicidade a invasão tecidual, a *Salmonella* possui um período de incubação de 18 a 36h ou 14 dias, a depender da espécie, e tem como principais sintomas dores abdominais, diarreia, náusea, vômito, febre e mal-estar (BRASIL, 2010).

O efeito desse microrganismo no ser humano, quando associado ao consumo do alimento, pode ser febre tifoide, causada pela *S. typhi* e febre entérica, causada pela espécie *S. paratyphi* A, B e C. A forma clínica de maior ocorrência é uma infecção também de origem alimentar conhecida como Salmonelose, caracterizada por febre, diarreia, dor abdominal e náusea (RIBEIRO, 2018).

Existem alguns fatores que contribuem para a contaminação dos alimentos por esse microrganismo. Alguns deles são refrigeração insuficiente, armazenamento de alimentos a temperaturas elevadas, cocção e reaquecimento inadequado, preparo de alimentos muitas horas antes do consumo, contaminação cruzada, alimentos e água contaminados e manipulação por profissionais infectados (BRASIL, 2010).

A Salmonelose é ocasionada pelas espécies de *Salmonella* sorovar não tifoide mencionadas anteriormente, *Salmonella Typhimurium* e *Enteritidis*. Dentre os alimentos envolvidos na contaminação por essas sorovares, os que possuem alto teor de gordura como chocolate, creme de amendoim, por exemplo, proporcionam o ambiente ideal para a sua sobrevivência no indivíduo, pois as enzimas digestivas e a acidez gástrica não são efetivas na eliminação desse microrganismo devido aos nódulos de gordura (CAMPAGNOLLO *et al.*, 2020).

No laboratório, quando se trata de isolamento e detecção desse microrganismo, a composição do alimento também pode ser um fator desafiador.

3 MÉTODOS DE DETECÇÃO LABORATORIAL

De acordo com a RDC Nº 724 da ANVISA (2022), que dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação, a análise de alimentos deve seguir pelo menos uma das referências abaixo.

- Código Alimentar (*Codex Alimentarius* - FAO/OMS);
- Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization* - ISO);
- Compêndio de Métodos para Análise Microbiológica de Alimentos (*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* - APHA);
- Métodos Padrão para Análise de Produtos Lácteos (*Standard Methods for the Examination of Dairy Products* - APHA);
- Métodos Padrão para Análise de Águas e Esgotos (*Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* - APHA);
- Manual Analítico Bacteriológico (*Bacteriological Analytical Manual* - BAM/FDA);
- Métodos Oficiais de Análise da AOAC *International* (*Official Methods of Analysis of AOAC International* - AOAC INTERNATIONAL);
- Farmacopeia Brasileira;
- Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia* - USP)

3.1 Tradicional

A ISO 6579-1:2007 descreve o método horizontal convencional para detecção da *Salmonella* spp. Através do uso de meios de cultura e condições de incubação específicas que proporcionam o crescimento desse microrganismo é realizado o isolamento, seguido de confirmação bioquímica ou sorológica. Esse fluxo de trabalho pode ser observado no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1 Meios de cultura e condições de incubação recomendados pela ISO para o método tradicional de *Salmonella* em alimentos.

Pré-enriquecimento	Enriquecimento seletivo	Isolamento	Confirmação Bioquímica	Confirmação sorológica
BPW (Água Peptonada Tamponada) a 37 ± 1 °C/18 ± 2h	RSV (Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja) a 41,5 ± 1 °C/24 ± 3h MKTTn (Caldo Tetracionato Muller-Kauffmann Novobiocina) a 37 ± 1 °C/24 ± 3h	XLD (Ágar Xilose Lisina Desoxicolato) a 37 ± 1 °C/24 ± 3h 2° meio de cultura - Opcional	Ágar TSI (Triplo Açúcar de Ferro) Ágar Ureia MRVP (Caldo De Vermelho De Metilo Segundo Voges-Proskauer) Água Tryptonada	Antígenos-O Antígenos-Vi Antígenos-H

Fonte: NBR ISO6579-1:2021

A partir do fluxograma apresentado anteriormente podemos observar que o tempo mínimo para detecção de *Salmonella* spp pelo método tradicional horizontal descrito pela ISO 6579 é de 5 dias, considerando que haverá crescimento conforme esperado em todas as etapas. Normalmente a liberação do resultado da análise ocorre entre 5 e 7 dias.

Uma possibilidade de melhorar o isolamento da colônia é dada no uso do ágar XLD e a escolha de um segundo ágar, que pode ser um meio cromogênico. Meios de cultura cromogênicos se diferenciam dos meios de cultura convencionais por utilizarem substratos enzimáticos baseados na atividade enzimática do microrganismo-alvo. A interação entre o

substrato contido no meio e o metabolismo do patógeno, relacionado à atividade enzimática, irá gerar colônias coloridas que o diferenciarão de outros microrganismos que não são de interesse. Assim como os meios convencionais, meios cromogênicos podem ser diferenciais e seletivos, inibindo microrganismos que não são de interesse através da adição de antibióticos, por exemplo, e evidenciando o microrganismo-alvo (PERRY, 2017).

Apesar dos benefícios dos meios cromogênicos, no caso da detecção de *Salmonella* spp o ágar XLD permanece como mandatório devido à superior sensibilidade desse meio convencional (PERRY, 2017).

3.2 Alternativos

Atualmente existem diversos métodos alternativos. De acordo com Feldsine *et al* (2006), método alternativo é todo aquele capaz de demonstrar ou estimar equivalência à metodologia de referência na análise do mesmo analito, para uma determinada categoria de produto. O método pode ser comercial, próprio, ou não e não precisa compreender todo o procedimento da análise, compreendido da preparação da amostra até o resultado do teste. Enquanto método de referência são os procedimentos descritos por AOAC, FDA/BAM ou USDA aplicados ao analito ou tipo de amostra que o método alternativo pretende detectar.

Segundo a RDC Nº 724 da ANVISA (2022), métodos alternativos podem ser utilizados, desde que garantam a equivalência às metodologias de referência, citadas anteriormente, ou que sejam certificados por órgãos independentes, de acordo com o protocolo descrito pela ISO 16140 ou protocolos similares aceitos internacionalmente.

Os três maiores órgãos certificadores de métodos alternativos são AOAC *International*, AFNOR (*Association Française de Normalisation*) e MicroVal. Dentro de cada órgão há diferentes procedimentos para a certificação, realizando estudos preliminares, colaborativos e interlaboratoriais.

Para a detecção de *Salmonella* as categorias de métodos alternativos são: molecular, imunológico e por biossensores. Dentre os testes imunológicos, destacam-se o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), teste de aglutinação em látex e ensaios de imunodifusão. Quanto aos biossensores, os mais utilizados são com transdutores eletroquímicos. A maioria dos testes moleculares são pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, por ser altamente sensível, é o teste mais utilizado para a detecção do referido patógeno em alimentos (MELO *et al.*, 2018).

O FSIS divulga anualmente a relação de testes e kits que foram validados e reconhecidos pelas organizações independentes, como a norte-americana AOAC, francesa AFNOR, europeia MicroVal e nórdica NordVal. Atualmente existem, aproximadamente, 150 testes validados e em sua maioria são do tipo molecular (FSIS, 2022).

Os fluxos de trabalho dos testes mencionados no Quadro 2 possuem tempos de liberação de resultado semelhantes, considerando da extração do DNA ou lise bacteriana até a detecção do patógeno, sendo em média 1 hora e 40 minutos, aproximadamente.

Em relação à técnica aplicada, PCR é uma metodologia que possui diversas modificações, sendo a qPCR uma das técnicas comumente utilizadas e que permite o monitoramento em tempo real do produto da amplificação, utilizando um termociclador. Ao final da reação é possível observar se houve a amplificação do alvo e a curva de amplificação do controle interno positivo, também conhecido pelas siglas em inglês IPC ou IAC. Na técnica de PCR são produzidas milhões de cópias do DNA-alvo, enquanto a técnica de LAMP produz bilhões de cópias. Isso faz com que tenha maior sensibilidade. Todavia, essa alta sensibilidade ocorre também em contaminação cruzada e, por isso, o laboratório deve ter sala ventilada, deve-se realizar protocolos de descontaminação antes e após os testes, além de analisar amostras separadamente (SOROKA *et al.*, 2021).

Quadro 2 Testes moleculares comerciais para detecção de *Salmonella* em alimentos.

Fabricante	Nome do teste	Técnica	Aplicação	Amostragem validada
3M	3M™ Molecular Detection Assay (MDA) <i>Salmonella</i> Method	LAMP ¹	Alimentos para humanos e amostras ambientais	25g, 325g, 375g, 30 mL, 100 mL
Hygiena	BAX® System <i>Salmonella</i>	qPCR ²	Alimentos para humanos e animais, e amostras ambientais	25g, 325g, 375g, 15 mL, 30 mL
Bio-Rad	iQ-Check <i>Salmonella</i> II Real-Time PCR test kit	qPCR	Alimentos para humanos e amostras ambientais	25g, 375g
Thermo Fisher Scientific	SureTect™ <i>Salmonella</i> Species PCR Assay	qPCR	Alimentos para humanos e animais, e amostras ambientais	25g, 375g

Legenda: 1 – Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP); 2 – Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR).

Fonte: FSIS, 2022

O produto-alvo da reação na técnica de LAMP é pequeno, portanto, qualquer contaminação da amostra com material genético exógeno pode interferir no resultado. Para verificar possíveis inibidores da reação, deve-se realizar duas reações separadas, uma para verificar os inibidores e outra para as amostras (SOROKA *et al.*, 2021).

3.3 Protocolos para detecção em matriz cacau ou produtos de chocolate

Fatores intrínsecos (pH, atividade de água, composição química, potencial de óxido-redução, estrutura biológica) e fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa, composição gasosa do ambiente) estão relacionados às alterações em alimentos e favorecem a multiplicação dos microrganismos (BRASIL, 2010).

Em relação à atividade de água (Aa), a *Salmonella* não se multiplica em alimentos com Aa inferior à 0,93, mas pode permanecer estável e viável em alimentos com baixa Aa, além de possuir resistência térmica (GERMANO, 2008).

O cacau, por exemplo, é um alimento com alto teor de gordura e açúcar, o que confere uma baixa atividade de água (Aa) e conseqüentemente um efeito “protetor” à *Salmonella*, podendo permanecer por até 2 anos em produtos de chocolate (CARLIN *et al.*, 2020).

Esse fator, somado ao tratamento do cacau para o processamento de chocolate, como o tratamento térmico da torração ou conchagem, faz com que a *Salmonella* permaneça por maiores períodos de tempo no alimento, ainda que suas células estejam injuriadas devido ao estresse ocasionado pelas condições citadas (GONÇALVES, 2014).

Os métodos alternativos permitem uma análise mais rápida desse tipo de amostra, podendo utilizar protocolos diferenciados para essas matrizes específicas. Alguns desses protocolos de enriquecimento podem ser observados no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3 Protocolos dos testes comerciais para detecção de *Salmonella* em amostras de cacau e/ou produtos de chocolate.

Nome do teste	Cacau/produtos de chocolate	Amostra	Caldo	Temperatura	Tempo
3M™ (MDA) <i>Salmonella</i> Method – 3M	Cacau em pó	25g	225 mL BPW ISO	37° ± 1°C	24-28h
BAX® System <i>Salmonella</i> - Hygiene	Cacau	25g	225 mL NFDM-BG	35°C	22-26h
iQ-Check <i>Salmonella</i> II Kit – Bio-Rad	Chocolate	375g	3.000 mL Skim milk	37° ± 1°C	20 ± 2h
SureTect™ <i>Salmonella</i> Species PCR Assay – Thermo Fisher Scientific	Chocolate	25g	225 mL CSR (Cocoa Sample Recovery)	34-38°C	20-28h
	Cacau em pó, licor de cacau, manteiga de cacau, chocolate amargo (>70%)	375g	3.375 mL BPW ISO/nonfat dry milk	34-38°C	22-30h (BPW); 20-28h (NFDM)

Fonte: 3M (2019), HYGIENA (2022), BIO-RAD (2020), SCIENTIFIC (2022).

Para todos os kits comerciais apresentados acima, o fluxograma após o enriquecimento da amostra segue para a etapa de lise ou extração do DNA, com exceção do kit BAX® System *Salmonella*, que requer um preparo prévio, a transferência de uma alíquota do enriquecido para o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (BIO-RAD, 2020).

Importante citar também que os polifenóis, compostos bioativos presentes no cacau possuem propriedade antimicrobiana, o que interfere na recuperação das células injuriadas e se torna um inibidor da reação de PCR, por exemplo (CARLIN *et al*, 2020).

Por isso, os protocolos dos métodos alternativos apresentados no Quadro 3 para enriquecimento das amostras de cacau e produtos de chocolate utilizam meios de cultura diferentes nessa etapa inicial, quando comparado ao método tradicional pela ISO 6579.

A Água Peptonada Tamponada ISO (*Buffered Peptone Water ISO* – BPW ISO) é um meio de cultura não seletivo que permite a recuperação e multiplicação das células injuriadas ou em menor quantidade presentes no alimento, aumentando as chances de recuperação da *Salmonella* na amostra (OXOID, 2006).

De acordo com Wilson (1980), o meio NFDM (*Non-fat dry milk*) apresenta excelente recuperação de *Salmonella* em amostras de chocolate, quando utilizado em conjunto com a solução verde brilhante (NFDM-BG). Em relação ao meio *Skim milk*, a caseína presente no leite reduz as propriedades dos compostos polifenólicos do cacau, por exemplo (CARLIN *et al*, 2020).

O CSR (*Cocoa Sample Recovery*) foi desenvolvido com o objetivo de otimizar o tempo dessa recuperação e crescimento das células, além de neutralizar os inibidores de PCR

comumente associados às matrizes como cacau em pó, licor, manteiga e produtos de chocolate, tendo melhor performance quando comparado ao método tradicional, segundo Crabtree (2015).

3 SEGURANÇA DE ALIMENTOS

De acordo com o CDC (2022), a *Salmonella* é o maior agente causador de DTA, sendo responsável por mais de 1.35 milhões de infecções por ano nos Estados Unidos da América. O ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control* publicou recentemente uma atualização epidemiológica da contaminação de produtos de chocolate por *Salmonella Thyphimurium* em uma fábrica localizada na Bélgica. Devido ao *recall* realizado pela fábrica, o número de casos reduziu, mas cerca de 40% dos indivíduos necessitaram de internação hospitalar e alguns tiveram sintomas clínicos severos, como diarreia sanguinolenta. A detecção do patógeno foi realizada através de testes moleculares (ECDC, 2022).

No Brasil, a Instrução Normativa – IN nº 161 da ANVISA, estabelece que o padrão para considerar um lote aceitável é de ausência de *Salmonella* spp nas amostras de cacau e produtos de chocolate (ANVISA, 2022).

Segundo Ehuwa (2021), a *Salmonella* pode sobreviver em chocolate amargo por até 9 meses a 20°C e no chocolate ao leite por períodos superiores a 9 meses, na mesma temperatura.

Os dados apresentados reforçam a importância na garantia de alimentos saudáveis e sem risco à saúde ou à integridade dos consumidores, ou seja, a garantia da segurança de alimentos, do inglês *Food Safety*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme descrito anteriormente, o tipo de matriz e sua composição podem acrescentar um desafio na detecção do microrganismo-alvo. Alimentos contendo gorduras, proteínas complexas e propriedades antimicrobianas, por exemplo, podem ser chamadas de “amostras complexas”, por conterem interferentes na análise, ou seja, substâncias inibidoras. Além disso, a manipulação dos alimentos, saúde dos manipuladores, armazenamento e transporte também influenciam na garantia da qualidade relacionada à contaminação cruzada.

Alimentos com baixa atividade de água conferem um ambiente favorável para a estabilidade de microrganismos patogênicos, como a *Salmonella*. O mecanismo de produção de proteínas de estresse para sua manutenção nesse ambiente torna suas células injuriadas, reduzindo também em quantidade. Com isso pode ocorrer falha na detecção desse patógeno, seja pelo método tradicional ou alternativo.

As propriedades do cacau e produtos de chocolate não somente interferem no enriquecimento e recuperação das células de *Salmonella*, como também nas reações moleculares para detecção, como PCR em tempo real. O uso de protocolos de enriquecimento específicos para esse tipo de matriz torna-se primordial na obtenção de resultados confiáveis.

Na detecção pelo método tradicional, o uso de um meio de cultura cromogênico como meio secundário pode aumentar a especificidade do teste, comparado ao meio de cultura convencional. Por outro lado, esse método requer dias para se obter o resultado final.

Dentre os protocolos apresentados dos métodos alternativos, é possível verificar que todos apresentam meios de cultura que proporcionem o enriquecimento adequado para as matrizes de cacau, chocolate e derivados, visando otimizar a recuperação das células injuriadas. E, levando-se em consideração os desafios relacionados ao cacau, o uso de protocolos de enriquecimento específicos validados pela AOAC-OMA para diferentes apresentações dessa matriz (chocolate, licor, manteiga, por exemplo), com maior range para temperatura e tempo de incubação da amostra, pode proporcionar maior assertividade na detecção.

A diversidade de espécies e cepas, além da habilidade de sobreviver em ambientes de estresse, conferem um desafio ainda maior na rotina. Portanto, é de fundamental importância, para a detecção confiável e precisa, um método sensível e específico. Quando comparados ao tradicional, métodos alternativos permitem uma detecção rápida, dentro dos requisitos de qualidade mencionados, sem perder a acurácia.

Sendo o maior agente causador de DTAs, a urgência na detecção e redução do tempo de entrega dos resultados são essenciais para a segurança de alimentos, controle da *Salmonella* e, principalmente, para a saúde do consumidor. Como consequência, isso permite que o consumidor tenha confiança na marca, proporcionando benefícios também aos fabricantes de alimentos.

REFERÊNCIAS

3M. *3M™ Ensaio para Detecção Molecular de Salmonella 2 – Instruções do produto*. 2019. Disponível em: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1129363O/mda-2-salmonella-product-instructions.pdf>. Acesso em: out. 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Alerta GGMON 02/2022 (Nutriviigilância) - Contaminação por Salmonella Typhimurium em chocolates da marca Kinder, fabricados pela empresa Ferrero na Bélgica*. 2022. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2_groupId=33868&_101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2_urlTitle=alerta-ggmon-xx-2022-nutriviigilancia-contaminacao-por-salmonella-typhimurium-em-chocolates-da-marca-kinder-fabricados-pela-empresa-ferrero-na-belgica&_101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2_assetEntryId=6422862&_101_INSTANCE_WvKKx2fhjdjM2_type=content. Acesso em: ago. 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Instrução Normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022*. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em: jul. 2022.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução – RDC nº 724, de 1º de julho de 2022*. 2022. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413364812>. Acesso em: out. 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR ISO6579-1: Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal - Método horizontal para detecção, enumeração e sorotipagem de Salmonella - Parte 1: Detecção de Salmonella spp*. Rio de Janeiro: ABNT, 2021.

BIO-RAD. *iQ-Check Salmonella spp. II Kit – Guia do Usuário*. 2020. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/fsd/literature/10000131519.pdf>. Acesso em: out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158p.

BRINQUES, Graziela. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Pearson, 2016. E-book. ISBN 9788543017297. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br/Acervo/Publicacao/35542>. Acesso em: set. 2022.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* A quantitative risk assessment model for salmonellosis due to milk chocolate consumption in Brazil. *Food Control*, v. 107, a. 106804, 2020.

CARLIN, C. R. *et al.* Validation using diverse, difficult-to-detect *Salmonella* strains and a dark chocolate matrix highlights the critical role of strain selection for evaluation of simplified, rapid PCR-based methods offering next-day time to results. *Journal of Food Protection*, v. 83, n. 8, p. 1374-1385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-066>. Acesso em: out. 2022.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria Outbreaks*. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Acesso em: ago. 2022.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Acesso em: ago. 2022.

CRABTREE, D. *Evaluation of a New Enrichment Broth for the Preparation of Cocoa-Containing Samples Preceding the Thermo Scientific SureTect Salmonella species PCR Assay*. 2015. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-assets%2FMBD%2Fposters%2FEvaluation-Enrichment-Broth-Cocoa-Samples-SureTect-Salmonella-PCR-Assay-LT2180-EN.pdf>. Acesso em: nov. 2022.

DA SILVA, N. *et al.* *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Editora Blucher, 2017. E-book. ISBN 9788521212263. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521212263/>. Acesso em: set. 2022.

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. *3 June update: Monophasic Salmonella Typhimurium outbreak linked to chocolate products*. 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/3-june-update-monophasic-salmonella-typhimurium-outbreak-linked-chocolate-products>. Acesso em: set. 2022.

EHUWA, O. *et al.* Salmonella, food safety and food handling practices. *Foods*, v. 10, n. 907, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10050907>. Acesso em: nov. 2022.

FELDSINE, P. *et al.* AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, 2002. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12374420/>. Acesso em: out. 2022.

FERRARI, R. G. *et al.* Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol*, v. 85, f. 14, p. 1-21, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6606869/pdf/AEM.00591-19.pdf>. Acesso em: set. 2022.

FSIS – Food Safety and Inspection Service. *Foodborne Pathogen Test Kits Validated by Independent Organizations*. 2022. Disponível em: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/Validated-Test-Kit.pdf. Acesso em: set. 2022.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos*. Barueri: Manole, 2008.

GONÇALVES, J. D. *Por que a Salmonella se torna uma superbactéria quando a Aw é baixa?* São Paulo, 2014. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/por-que-a-salmonella-se-torna-uma-superbacteria-quando-a-aw-e-baixa/>. Acesso em: out. 2022.

HYGIENA. *BAX® System Real-Time PCR Assay Salmonella*. 2022. Disponível em: <https://cdn.brandfolder.io/VZSMQ4LE/at/v5rwkjq8cbsqhk3s8hqkn/ins-bax-q7-assay-salmonella-rt.pdf>. Acesso em: out. 2022.

LUSTOSA, A. G. *et al.* General aspects of infections by bacteria of the genus Salmonella, a public and animal health problem. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. 4-6, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13656>. Acesso em: sep. 2022.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Salmonelas*. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas#:~:text=Esta%20bact%C3%A9ria%20est%C3%A1%20caracterizada%22em,%2C%20diarizonae%2C%20hutnae%20e%20indica>. Acesso em: set. 2022.

MELO, A. *et al.* *Métodos alternativos para detecção de Salmonella em alimentos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018. 22 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 183). Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189768/1/DOC18005.pdf>. Acesso em: set. 2022.

OXOID. *The Oxoid Manual – 9th Edition*. Basingstoke, 2006.

PERRY, John D. A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in na era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 2, p. 449-479, 2017. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.00097-16>. Acesso em: nov. 2022.

RIBEIRO, Bernardo. *Microbiologia Industrial - Alimentos*. São Paulo: Grupo GEN, 2018. v. 2. E-book. ISBN 9788595152151. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595152151/>. Acesso em: set. 2022.

SCIENTIFIC, T. F. *SureTect™ Salmonella species PCR Assay User Guide*. 2022. Disponível em: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0017724-SureTectSalmonella-PCRAssay_AOAC-UG.pdf. Acesso em: out. 2022.

SILVEIRA, D. R. *et al.* Qualidade microbiológica de produtos de origem animal encaminhados para alimentação escolar. *Ciência Animal Brasileira*. Goiás, v. 20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-43226>. Acesso em: set. 2022.

SOROKA, M. *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*. v. 10, n. 8, p. 1931, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10081931>. Acesso em: nov. 2022.

WILSON, C.D.R. *et al.* Recovery of salmonella from milk chocolate using a chemically defined medium and five nondefined broths. *Journal of Food Science*, v. 45, p. 310-313, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb02602.x>. Acesso em: nov. 2022.