

RAQUEL GOUVÊA

**COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIOLÓGICO
CONVENCIONAL E PCR NA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM
AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE
CONTAMINADAS E DE CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA
Co-orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

NITERÓI
2009

G719 Gouvêa, Raquel

Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de Salmonella spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo / Raquel Gouvêa. - 2009.

54 f.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2009.

Orientadora: Virginia Léo de Almeida Pereira

1. Contaminação da carne. 2. Carne de ave. 3. Salmonella. 4. Reação em Cadeia da Polimerase I.
Título.

CDD 664.07

RAQUEL GOUVÊA

**COMPARAÇÃO ENTRE ISOLAMENTO BACTERIOLÓGICO
CONVENCIONAL E PCR NA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM
AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE
CONTAMINADAS E DE CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 18/02/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Virginia Léo de Almeida Pereira
UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
UFF

Prof^a. Dr^a. Dayse Lima da Costa Abreu
FAA/CESVA

NITERÓI
2009

Aos meus pais, Wagner e Vandete, dedico esta conquista por tudo o que representam e me ensinaram. Pelo amor, incentivo, amizade e apoio em todas as fases da minha vida, e pela compreensão pelos muitos momentos que não pude compartilhar com eles durante esses dois anos de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Virginia Léo de Almeida Pereira, pela confiança, respeito, amizade e pela doação de preciosos ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Robson Maia Franco, pela paciência, disponibilidade e orientação.

À querida amiga Samira Pirola Santos Mantilla, pela amizade e por ter sido a maior incentivadora para o meu ingresso no mestrado.

Aos novos amigos Leandro Machado, Felipe Faccini, Fernanda Martinez Xavier Alves, Liana Ogino, Davi de Oliveira Almeida, Juliana Almeida, Gabriel dos Santos Almeida, Vanessa Simas e Ariane Amorim, pelo valioso auxílio, contribuição e amizade.

Ao professor Elmiro Rosendo do Nascimento, pela orientação, paciência e pela grande contribuição para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Júlio Rocha Machado, pelo respeito, compreensão, cumplicidade e amor.

À minha irmã, Ludimila Gouvêa, pelo incentivo, apoio e preocupação.

Às amigas Lígia Rizutto e Camila Mantilla, pela grande amizade.

Ao professor Elci Lotar Dickel pela contribuição literária.

Ao Drausio Ferreira, pela disponibilidade e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo da Vinci).

SUMÁRIO

RESUMO, p.13

ABSTRACT, p.14

1 INTRODUÇÃO, p.15

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.17

2.1 A CARNE DE FRANGO, p.17

2.2 *Salmonella spp.*, p.18

2.3 SALMONELOSES, p.19

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella spp.*, p.24

2.4.1 **Método Convencional**, p.24

2.4.2 **Reação em Cadeia da Polimerase – “Polymerase Chain Reaction” – PCR**, p.24

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.27

3.1 AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, p.27

3.2 ENSAIOS LABORATORIAIS, p.28

3.2.1 **Método Convencional**, p.28

3.2.2 **Reação em Cadeia da Polimerase**, p.30

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS, p.32

4 RESULTADOS, p.33

5 DISCUSSÃO, p.39

6 CONCLUSÕES, p.43

7 OBRAS CITADAS, p.44

8 OBRAS CONSULTADAS, p.51

9 APÊNDICE, p.53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 Características morfológicas típicas de *Salmonella* spp em diferentes meios sólidos, p.29.

QUADRO 2 Características bioquímicas de *Salmonella* spp. nos meios de triagem ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) e “Lysine Iron Agar” (LIA), p.29.

QUADRO 3 Características bioquímicas de *Salmonella* spp. nos meios caldo Uréia, Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) e ágar Fenilalanina, p.30.

FIGURA 1 Cultivo em ágar *Salmonella* Diferencial Modificado. Colônias vermelhas são compatíveis com características de *Salmonella* spp. (seta), p. 33.

FIGURA 2 Cultivo em ágar Verde-Brilhante Modificado. Colônias rosas são compatíveis com características de *Salmonella* spp. (setas)FIGURA 2 Cultivo em ágar Verde-Brilhante modificado. Colônias rosas são compatíveis com características de *Salmonella* spp. (setas), p. 34

FIGURA 3 Cultivo em ágar MacConkey. Colônias translúcidas compatíveis com características de *Salmonella* spp. (seta), p.34.

FIGURA 4 Cultivo em ágar *Salmonella Shigella*. Colônias incolores com ou sem centro preto compatíveis com características de *Salmonella* spp. (setas), p.34.

FIGURA 5 Cultivo em ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) e ágar “Lysine Iron Agar” (LIA). Comportamentos bioquímicos compatíveis com *Salmonella* spp., p.35.

FIGURA 6 Cultivo em ágar Fenilalanina no teste bioquímico da Desaminação da Fenilalanina. 1 e 2 negativos para para o teste, característicos de *Salmonella* spp.; 3 positivo, p. 35.

FIGURA 7 Cultivo em caldo uréia no teste bioquímico da Urease. 1 amostra urease positiva; 2 urease negativa, característica de *Salmonella* spp., p. 35.

FIGURA 8 Cultivos em meio sulfeto-indol-motilidade (SIM) no teste bioquímico SIM. 1 e 2 produção de sulfeto, indol negativo, com motilidade; 3 e 4 sulfeto negativo, indol negativo, sem motilidade, p.36.

FIGURA 9 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. M. Marcador de DNA de 100pb, 1 controle positivo, 2 a 9 e 11 a 14 amostras positivas; 10 e 16 controles negativos; 15 amostra não inoculada com *S. Enteritidis* (controle), p.36.

FIGURA 10 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. M. Marcador de DNA de 100pb, 1 a 4 amostras positivas; 6 controle positivo; 7 controle negativo; 5 amostra não inoculada com *S. Enteritidis* (controle), p.36.

FIGURA 11 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras de campo. M Marcador de DNA de 100pb, 1 a 10 amostras negativas; 11 controle positivo.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Frequência de detecção de *Salmonella* spp. pela PCR e pelo método convencional em amostras de peito de frango contaminadas artificialmente e em amostras de campo, p.37.

TABELA 2 Relação entre meios de enriquecimento e meios sólidos na recuperação de *Salmonella* spp. em amostras de peito de frango inoculadas com *S. Enteritidis*. Total de resultados positivos por amostra, p.38.

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
A	Adenina
ABEF	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	“American Type Culture Collection”
BHI	“Brain Heart Infusion”
BS	Bismuto Sulfito
C	Citosina
CDC	“Centers for Disease Control”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
DNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
µM	Micromolar
pmol	Picomol
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid”
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
<i>Inv</i>	“Invasion”
LIA	“Lysine Iron Agar”
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	MacConkey

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N	Normal
°C	Graus Celsius
NMKL	“Nordic Committee on Food Analyses”
OPS	“Organización Panamericana de la Salud”
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
RV	Rappaport Vassiliadis
SC	Selenito-Cistina
SDM	<i>Salmonella</i> Diferencial Modificado
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIM	Sulfeto-Indol-Motilidade
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum
spp.	Espécies
SS	<i>Salmonella</i> Shigella
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
subsp.	Subespécie
T	Timina
TE	Tris-EDTA
TSI	“Triple Sugar Iron”
Tris	“Tris-hydroxymethyl-aminomethane”
TT	Tetrionato
UBA	União Brasileira de Avicultura
VBM	Verde-Brilhante Modificado
WHO	“World Health Organization”
XLD	“Xylose Lysine Deoxycholate”

RESUMO

A salmonelose compreende uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde coletiva por ser de difícil controle, causar elevada morbidade e grandes impactos sócio-econômicos. A maioria dos casos de infecção alimentar causada por *Salmonella* spp. decorre do consumo de alimentos contaminados, especialmente a carne de frango e derivados preparados sob condições impróprias de higiene, manipulação e conservação. Para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, o método convencional de isolamento e identificação é o mais utilizado e está previsto na legislação brasileira, mas a técnica é demorada e bastante laboriosa. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método rápido e sensível na detecção de agentes como *Salmonella* spp., tem sido bastante estudado e gradativamente empregada nas indústrias de alimentos. O objetivo deste estudo foi comparar a análise bacteriológica convencional com a PCR na detecção de *Salmonella* spp. em peito de frango comercializado no varejo. Foram realizadas 34 repetições em análises de amostras inoculadas artificialmente com *S. Enteritidis* e 31 repetições em amostras de campo. Tanto o método convencional quanto a PCR foram capazes de detectar *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente. No entanto, nas amostras de campo, a detecção de *Salmonella* spp. somente foi possível pelo método convencional. E a PCR foi mais rápida na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango.

Palavras-chave: Comparação, método convencional, PCR, *Salmonella* spp.

[Digite texto]

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most challenging zoonoses to public health, due to its difficult control, high morbidity, as well as its economic and social impacts. Most cases of *Salmonella* food borne diseases are caused by the ingestion of contaminated food, especially poultry meat and poultry products processed under improper conditions. Conventional culture-based methods are widely used to detect *Salmonella* spp. in foods and it is contemplated in Brazilian law, although the technique is laborious and time-consuming. Polymerase Chain Reaction (PCR) which is a fast, sensitive and useful method to detect food borne pathogens, such as *Salmonella* spp., has been quite researched and gradually employed in food industries. The objective of this study is to compare conventional culture-based method to PCR for *Salmonella* spp. detection in poultry meat. Thirty-four artificially inoculated chicken meat with *S. Enteritidis* samples and thirty-one naturally contaminated samples have been analyzed. Both methods were capable of detecting *Salmonella* spp. in artificially contaminated samples. PCR has been faster on detection of *Salmonella* spp. Only conventional culture-based methods could detect *Salmonella* spp. in naturally contaminated samples.

Keywords: Comparison, conventional culture-based method, PCR, *Salmonella* spp.

[Digite texto]

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é considerado por muitos autores como um dos patógenos mais importantes causadores de surtos de infecções alimentares em todo o mundo. Seu estudo tem grande importância para a saúde coletiva pelo fato de causar uma enfermidade de difícil controle, em virtude de se apresentar distribuído amplamente na natureza, possuir uma grande variedade de reservatórios, ser extremamente patogênico para o homem e para muitas espécies animais e ter sua disseminação favorecida por indivíduos portadores assintomáticos (BERSOT, 2006).

Salmonella spp. já foi isolada de alimentos de variadas composições. No entanto, é mais comumente isolada de carne bovina, ovos e carne de aves, especialmente carne de frango. As infecções humanas geralmente estão associadas ao consumo de carne de frango ou de ovos mal cozidos ou indevidamente manipulados, de forma a permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. no alimento (CAMPOS, 2005; OPS, 2003).

Os métodos convencionais de isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos estão previstos na legislação brasileira, contudo, demandam dias para a confirmação do gênero, além de serem bastante trabalhosos. Portanto, apesar de confiável, a técnica convencional dificulta o monitoramento da contaminação bacteriológica na cadeia produtiva do alimento e, ainda, desfavorece a adoção de medidas emergenciais, na indústria, para conter a liberação de lotes que porventura estejam contaminados (VON RÜCKERT, 2006). Métodos rápidos de diagnóstico bacteriológico têm sido desenvolvidos nos últimos anos com vistas a reduzir o tempo de análise, sendo ainda métodos específicos, sensíveis e práticos.

A PCR é comprovadamente um método rápido, sensível e específico na detecção de agentes patogênicos, como *Salmonella* spp. Tem sido bastante estudada e gradativamente empregada nas indústrias de alimentos de modo a otimizar o controle sobre este agente.

Este estudo visa comparar a análise bacteriológica convencional com a PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de peito de frango artificialmente contaminadas e de campo comercializadas no varejo quanto à frequência de detecção e tempo demandado para os testes e verificar em quais meios de enriquecimento e plaqueamento o isolamento de *Salmonella* spp. tem melhores resultados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CARNE DE FRANGO

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2009), no ano de 2008, houve um crescimento de 11% nas exportações de carne de frango, comparado ao ano de 2007, totalizando 3,6 milhões de toneladas. As expectativas para o ano de 2009 são de um crescimento não tão expressivo quanto os resultados alcançados nos anos anteriores, em função da crise financeira internacional.

O Brasil é o maior exportador de carne de frango desde o ano de 2004 e ocupa a terceira colocação em produção mundial de carne de frango, ficando atrás somente da China e dos Estados Unidos, com um volume de produção de 10,2 milhões de toneladas em 2007. É o quarto maior consumidor mundial de carne de frango, ficando atrás dos EUA, China e União Européia. O consumo de carne de frango no Brasil também é bastante elevado e, em 2007, de janeiro a agosto, foi de 37,8 kg por habitante (UBA, 2008).

Diante deste panorama, o mercado internacional de carne de frango exige o monitoramento sanitário dos plantéis avícolas, além do controle da qualidade da carne de frango e seus derivados. Além disso, o mercado interno destes produtos exige alto padrão de qualidade e segurança dos produtos fornecidos (VON RÜCKERT, 2006).

Doenças como as salmoneloses são de controle obrigatório na produção de aves e estão incluídas no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual foi instituído pela Portaria nº193, de 19 de setembro de 1994 (BRASIL, 1994), considerando a

[Digite texto]

importância da avicultura industrial nacional, o posicionamento do Brasil no mercado internacional de carne de aves e a situação sanitária da avicultura brasileira.

Quanto aos padrões sanitários nacionais para alimentos, na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12 de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é aprovado o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, no qual está estabelecido que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25g de carnes resfriadas ou congeladas, *in natura*, de bovinos, suínos e outros mamíferos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes), carnes moídas, miúdos de bovinos, suínos e outros mamíferos, ovos e derivados (BRASIL, 2001) e para carnes resfriadas ou congeladas *in natura* de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes), há padrões somente para coliformes termotolerantes a 45°C/g, mas não há padrões para *Salmonella* spp. No entanto, na RDC nº39 de 2002 (BRASIL, 2002) é aprovado o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carnes de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados, no qual há instruções obrigatórias para que sejam incluídas na rotulagem dos produtos recomendações de uso, preparo e conservação para possibilitar o controle dos riscos quanto ao consumo de alimentos que possam estar contaminados com *Salmonella* spp.

2.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi nomeado como tal em homenagem ao bacteriologista Daniel E. Salmon em 1885 (GAST, 2003; HOLT et al., 1994). É pertencente à família *Enterobacteriaceae*, cresce sob temperaturas entre 8°C e 45°C, a um pH de 4,0 a 8,0 e não resiste a temperaturas superiores a 70°C (OPS, 2003). Apresenta-se como bacilos Gram negativos em esfregaços corados pelo método de Gram. Não produz esporos, é anaeróbio facultativo e não fermenta lactose, ao contrário da maioria das espécies da família *Enterobacteriaceae* (HOLT et al., 1994). Todavia, algumas salmonelas podem ser fermentadoras de lactose, a partir da aquisição de plasmídeos transportadores de genes codificadores de enzimas que permitem a fermentação da lactose (plasmídeos lac+), e produzem colônias lactose positivas (CAMPOS, 2005). Outra característica peculiar da família *Enterobacteriaceae* e, portanto, das salmonelas, é a capacidade de reduzir nitratos a

[Digite texto]

nitritos e produzem gás a partir da fermentação da glicose. A maioria é móvel, por meio de flagelos peritríquios, com exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, que são imóveis (HOLT et al., 1994). Os sorotipos móveis são usualmente descritos como salmonelas paratíficas (GAST, 2003).

A nomenclatura dada à *Salmonella* foi, inicialmente, baseada na doença e/ou no animal no qual se isolou a bactéria e continua a ser utilizada na bacteriologia, como *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*. Esse tipo de nomenclatura foi abandonado por não representar verdadeiramente, através do nome, a doença promovida pela bactéria e seus hospedeiros. O que se aplica atualmente são nomes de cidades, regiões ou países onde a salmonela foi primeiramente isolada ao seu nome, como *S. london* e *S. panama* (HOLT et al., 1994).

Após várias alterações na taxonomia de *Salmonella* spp., a classificação atual divide o gênero em *S. enterica* e em *S. bongori*. *S. enterica* é subdividida em seis subespécies, a saber: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *indica* (HOLT et al., 1994). Até a presente data, já foram identificados 2579 sorotipos de *Salmonella* spp. Destas, 2557 pertencem à espécie *Salmonella enterica* e apenas 22 à *Salmonella bongori* (GRIMONT; WEILL, 2007). A subespécie *enterica* engloba os sorotipos clinicamente mais importantes para humanos e animais.

2.3 SALMONELOSES

A salmonelose é uma das doenças infecciosas mais comuns no mundo (OLIVEIRA et al., 2003) e uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde coletiva, em função da elevada endemicidade e morbidade e pela dificuldade no controle (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais o seu habitat primário (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001).

A doença nas aves pode ocorrer, muitas vezes, na forma clínica ou na manutenção do estado de portador assintomático, tornando-se fonte de disseminação da bactéria pelas fezes das aves infectadas ou por seus produtos contaminados para seres humanos, animais e ambiente (GAST, 2003; HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997). Hofer, Silva Filho e Reis (1997) afirmaram que a

[Digite texto]

ocorrência de salmonelose decorre, na maioria dos países, do grande crescimento da indústria avícola, dentro da visão econômica típica de produção. Segundo Berchieri Júnior e Oliveira (2006), em virtude do desenvolvimento do setor industrial, a avicultura passou a produzir volumes muito superiores e em menor espaço de tempo e, para isto, foi preciso concentrar um número maior de aves por metro quadrado, o que favoreceu a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp.

As salmoneloses nas aves causam grandes prejuízos econômicos pela elevada mortalidade e pelas quedas acentuadas no desempenho zootécnico (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* são hospedeiros naturais de aves e determinam a pulorose e o tifo aviário, respectivamente (GAST, 2003). A pulorose é caracterizada por acometer mais comumente as aves jovens, tem elevada mortalidade, principalmente entre a segunda e a terceira semana de vida e sua principal transmissão é a vertical. As aves que porventura sobrevivem à doença, podem se tornar portadoras e disseminar a bactéria pela via transovariana e/ou pela transmissão horizontal (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). O tifo aviário, por sua vez, é uma salmonelose cujos relatos são mais frequentes em aves adultas, no entanto, pode determinar alta mortalidade em aves jovens no primeiro mês de vida (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). A transmissão horizontal pode decorrer, dentre outros fatores, do canibalismo e da ingestão de ovos e rações contaminadas com *Salmonella* spp. (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006; OPS, 2003). Os insetos podem participar como vetores mecânicos em ambientes muito contaminados (OPS, 2003) e, da mesma forma, os animais silvestres e de estimação (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006) podem contribuir para a infecção.

A mortalidade e a morbidade em ambas as salmoneloses aviárias são variáveis e são influenciadas pela idade, nutrição, manejo, doenças concomitantes e pela dose bacteriana (GAST, 2003). As perdas podem ser altas nos quadros graves, onde a consequência, em sua maioria, é a eliminação das aves infectadas (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

As salmonelas paratíficas ou zoonóticas, que são os sorotipos móveis de *Salmonella* spp., podem infectar uma grande variedade de animais e os humanos, muitas vezes de forma assintomática (GAST, 2003). Nas aves, o paratifo aviário

[Digite texto]

pode ocorrer em decorrência da transmissão transovariana ou da transmissão horizontal (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2006). No entanto, a sua maior importância reside no potencial risco de causar infecções alimentares em humanos pela ingestão de alimentos contaminados com salmonelas paratíficas. A maioria dos casos de salmonelose humana decorre do consumo de alimentos contaminados. Contudo, muitos pesquisadores concordam que a carne de frango e seus derivados são umas das mais importantes fontes de *Salmonella* spp. A ocorrência e a quantidade deste gênero presentes na carne de frango ao abate variam em função das condições de manejo na criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate e manipulação das carcaças (CARVALHO; CORTEZ, 2005). No entanto, a manipulação inadequada do alimento pronto para o consumo pode permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. em níveis passíveis de ocasionar surtos de infecção alimentar (GAST, 2003), os quais podem advir ainda do contato do produto pronto com o alimento cru, ou por meio do consumo da carne ou alimento mal cozidos, da manutenção do alimento por muitas horas fora de refrigeração e do aquecimento inadequado antes de servi-lo (OPS, 2003).

Alimentos de origem vegetal também podem ser veiculadores de *Salmonella* spp. para seres humanos, por contaminação destes alimentos com produtos de origem animal, por falhas higiênico-sanitárias durante o seu processamento ou no preparo do alimento pronto para o consumo nas cozinhas comerciais e residenciais. Os grandes surtos se devem, na maioria das vezes, ao manejo inadequado do alimento pronto (OPS, 2003).

No período de 1998 a 2002, foram reportados 6.647 surtos de doenças transmitidas pela ingestão de alimentos nos EUA com 128.370 pessoas doentes. Os patógenos bacterianos foram responsáveis pela maioria dos surtos, nos quais *S. Enteritidis* foi a bactéria mais envolvida e *Listeria monocytogenes* foi a maior causadora de mortes (CDC, 2006). Segundo Buzby et al. (1996), nos Estados Unidos, entre 2,9 a 6,7 bilhões de dólares são destinados anualmente aos custos decorrentes de doenças alimentares transmitidas especificamente por bactérias.

No Brasil, Taunay et al. (1996) estudaram a frequência de isolamentos de sorotipos de *Salmonella* spp., entre 1950 e 1990, no Estado de São Paulo e observaram, a partir da década de 70, o declínio na ocorrência de *S. Typhi* e o aumento de *S. Typhimurium* e *S. Agona* entre outros sorotipos. Entre 1983 e 1990, mais de 70% das infecções intestinais, bacteremias e meningites causadas por *S.*

[Digite texto]

Typhimurium e *S. Agona* ocorreram em crianças com menos de cinco anos de idade.

Peresi et al. (1998), em estudo epidemiológico de surtos de salmonelose ocorridos entre 1993 a 1997 na região Noroeste do Estado de São Paulo, obtiveram como resultados o total de 906 indivíduos adoecidos e *S. Enteritidis* fagotipo 4 foi o sorotipo mais isolado tanto em amostras de fezes como em amostras de alimentos. Segundo Silva e Duarte (2002), houve grande aumento de isolamentos de *S. Enteritidis* em produtos avícolas, a partir de 1993 até 2001, no Brasil, e a manutenção deste sorotipo como o principal responsável por infecções alimentares humanas até o ano de 2001.

Dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), sobre surtos ocorridos no Brasil entre 1999 e 2008, mostram que ocorreram 6.062 surtos de doenças transmitidas pela ingestão de alimentos (DTA), com 117.330 doentes e 64 mortes. A maioria dos surtos registrados foi causada por *Salmonella* spp. e os Estados com maior ocorrência de surtos foram o Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná. No entanto, os números não traduzem a real situação das ocorrências em todas as Unidades Federativas, pois as notificações se concentram nos Estados onde a vigilância epidemiológica das DTAs está melhor implantada, ou seja, nos Estados do Sul e Sudeste (BRASIL, 2008).

Os sintomas da salmonelose no homem são inespecíficos e surgem em 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado e geralmente são caracterizados por náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaléia, calafrios e diarreia. Os sintomas podem também ser acompanhados por fraqueza, fadiga muscular e febre. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida e 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005). A salmonelose geralmente tem cura espontânea e a recuperação clínica se dá em até quatro dias, no entanto, o indivíduo portador convalescente pode eliminar a bactéria por semanas ou até por alguns meses (OPS, 2003).

Pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças podem apresentar complicações graves da doença. Tavechio et al. (1996) avaliaram isolamentos de *S. Enteritidis* realizados entre 1991 e 1995 de infecções humanas e amostras não humanas e verificaram um aumento significativo no ano de 1993 relacionado, entre outras coisas, a hemoculturas de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Diante disto, afirmaram que a septicemia é uma complicação

[Digite texto]

comum e crescente nesses pacientes e atentaram para o desafio do tratamento da salmonelose.

O tratamento no homem com antimicrobianos geralmente não é indicado, pois prolonga o período de eliminação da bactéria pelas fezes e pode determinar o aparecimento de cepas multirresistentes. Contudo, o tratamento pode ser indicado nos casos de salmoneloses com complicações sistêmicas e na febre tifóide (CAMPOS, 2005).

Os sorotipos adaptados ao ser humano são *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B e C* (CAMPOS, 2005) e causam a febre tifóide e a febre entérica, respectivamente (SHINOHARA, 2008). Estima-se que ocorram 21 milhões de casos e 200 mil mortes por ano em decorrência de febre tifóide em todo o mundo (CDC, 2005). A ocorrência desta doença deve-se principalmente a situações precárias de saneamento, higiene pessoal e ambiental, por isso, a febre tifóide praticamente inexistente em países onde estes problemas foram superados (BRASIL, 2005). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, no Brasil (BRASIL, 2005), a doença ocorre sob a forma endêmica, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, devido às condições de vida de grande parte da população, mas tende a haver uma redução no número de casos. No entanto, a sub-notificação prejudica a veracidade dos dados epidemiológicos, pois, dentre outros motivos, muitos casos não são diagnosticados e casos suspeitos não são conhecidos (SHINORARA et al., 2008).

Indivíduos com febre tifóide carregam *S. Typhi* na corrente sanguínea e no trato intestinal, e aqueles que se recuperam da doença clínica e se tornam portadores continuam a eliminar a bactéria pelas fezes, muitas vezes por longos períodos. Os sintomas característicos são febre prolongada, cefaléia, constipação, mal-estar e mialgia. Nos casos graves pode ocorrer delírio, perfuração intestinal e morte (CDC, 2005).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.

2.4.1 Método Convencional

O método convencional de isolamento e identificação bacteriológica de *Salmonella* spp. é amplamente empregado e prescrito em legislações específicas. Consiste nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, identificação bioquímica e prova de soro-aglutinação (BRASIL, 1995a; 1995b; 2003). No entanto, esses testes geralmente demandam um tempo mínimo de cinco dias podendo alcançar até sete dias, se forem realizadas provas bioquímicas e sorologia (DICKEL, 2004). Além disso, muitas vezes, não são suficientemente específicos (LÖFSTROM et al., 2004).

A técnica é demorada e trabalhosa, pois, necessita de muitos reagentes e vidraria, principalmente quando no processamento de um grande número de amostras, como as que são exigidas nas indústrias de alimentos. Portanto, métodos de diagnósticos mais rápidos são extremamente necessários para a tomada de decisões em tempo real nas indústrias de alimentos, principalmente quando se trata de produtos perecíveis (VON RÜCKERT, 2006.).

O controle das salmoneloses depende de um incremento na velocidade e precisão dos testes diagnósticos, principalmente no monitoramento da produção zootécnica e de alimentos (SANTOS et al., 2001b). Métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. têm sido desenvolvidos, nos últimos anos, tais como ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” - ELISA), imunodifusão, hibridização do DNA e aglutinação em látex, porém, muitos desses métodos apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade, que limitam a sua aceitação (BLACKBURN, 1993).

2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase - “Polymerase Chain Reaction” - PCR

A PCR foi inicialmente descrita em 1986 pelo pesquisador Kary Mullis (MULLIS et al., 1986) e utiliza-se da síntese de ciclos repetidos de oligonucleotídeos de DNA para conduzir à replicação de sequências definidas, formando a base para a amplificação e detecção de sequências específicas de ácido nucléico (PERSING, 1991). Por detectar uma região única do genoma bacteriano, a técnica

[Digite texto]

da PCR demonstra maior especificidade do que os métodos bacteriológicos usuais (COHEN et al., 1994).

A aplicação da PCR, na detecção de alimentos contaminados, animais e pessoas infectadas, é uma estratégia atualmente utilizada e citada por muitos autores como eficiente e rápida e vem sendo empregada com êxito para detecção de vários micro-organismos, como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolytica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* (AABO et al., 1993; BENNETT et al., 1998; MALORNY et al., 2003; SANTOS et al., 2001a).

A rapidez na identificação de agentes etiológicos pela detecção do seu DNA, em comparação ao método bacteriológico, torna a PCR uma alternativa prática, além da sua alta sensibilidade e especificidade, dentre os métodos de diagnóstico das salmoneloses. No trabalho de Löfström et al. (2004), o tempo total necessário para detecção de *Salmonella* spp. em 14 tipos de alimentos para animais, através da técnica de PCR, foi inferior a 24 horas.

Flores et al. (2003) realizaram análise bacteriológica convencional, preconizada pela Portaria nº8, de 23 de janeiro de 1995, do MAPA (BRASIL, 1995a) e compararam com a técnica da PCR em amostras de ovos obtidos diretamente de produtores rurais de Santa Maria, no Estado do Rio Grande do Sul. Como resultado do estudo, a PCR foi tão eficiente quanto o método bacteriológico, com custo e tempo de análise significativamente inferior e concluíram que, através da técnica de PCR, é possível identificar lotes infectados com rapidez sem haver a necessidade de coletas de sangue, o que poderia facilitar a disseminação das bactérias.

Croci et al. (2004) compararam o método convencional com a técnica de ELISA e a PCR na detecção de *Salmonella* spp. em produtos derivados de carne suína, bovina e de aves, em sete momentos diferentes durante a incubação em caldo de pré-enriquecimento. E constataram que, mesmo em amostras pouco contaminadas experimentalmente, as técnicas de PCR e ELISA foram capazes de detectar *Salmonella* spp. após cinco horas de pré-enriquecimento. Em alguns produtos, a PCR foi capaz de identificar a presença de *Salmonella* spp. após quatro horas de incubação, demonstrando maior sensibilidade com relação à técnica de ELISA.

Von Rückert (2006) realizou trabalho semelhante, no qual comparou o método convencional com a imunoenálise e a técnica de PCR em cinco etapas do

[Digite texto]

fluxograma de abate de frangos, com a finalidade de indicar um método alternativo para o monitoramento no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Como resultado, a PCR e a imunob análise foram mais sensíveis, rápidas e práticas do que a metodologia convencional, e a PCR, especificamente, apresentou custo idêntico ao método convencional, contrariamente ao método imunobanalítico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises bacteriológicas e a PCR foram realizadas no Laboratório de Ornitopatologia e no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, respectivamente.

3.1.1 Amostras artificialmente contaminadas

Foram coletadas, em supermercados, duas amostras de peito de frango congelado, em embalagens de 1,0 kg, para a realização das análises em amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. Estas amostras foram transportadas em sua própria embalagem comercial e, após o descongelamento sob refrigeração “overnight”, foram fracionadas em sub-amostras de 25g, acondicionadas individualmente em sacos plásticos esterilizados próprios para homogeneização e estocadas sob congelamento.

Para a contaminação artificial das amostras, estirpes de *S. Enteritidis* ATCC 13057 foram cultivadas em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI, MERCK® 1.10493) por 18 horas a 37°C e, em seguida, o cultivo foi semeado em ágar nutriente inclinado e incubado a 37°C por 18 a 24 horas. A partir disso, foi preparada a suspensão bacteriana com a adição de solução salina peptonada 0,1% esterilizada, no cultivo em ágar nutriente, até a obtenção de turvação igual à do padrão nº1 na escala de McFarland, que consiste em 1 mL de cloreto de bário a 1% com 99 mL de ácido sulfúrico a 1% (0,36N), correspondendo a $3,8 \times 10^8$ micro-organismos por mililitro. Como controles, foram analisadas amostras sem a inoculação de *S. Enteritidis*.

[Digite texto]

Foram realizadas 34 repetições das análises em amostras inoculadas com *S. Enteritidis*.

3.1.2 Amostras de campo

Para análises de amostras de campo, foram coletadas amostras resfriadas de peito de frango em estabelecimentos comerciais varejistas. Estas amostras foram transportadas em sua própria embalagem comercial e acondicionadas em recipiente isotérmico contendo gelo. No laboratório, as amostras foram pesadas e separadas em sub-amostras de 25g, colocadas individualmente em sacos plásticos esterilizados próprios para homogeneização, sendo logo em seguida, processadas.

Foram realizadas 31 repetições nas amostras de campo.

3.2 ENSAIOS LABORATORIAIS

3.2.1 Método Convencional

O isolamento de *Salmonella* spp. (APÊNDICE 1) foi baseado na Instrução Normativa nº62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Para o pré-enriquecimento das amostras, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada 1% a 25g de peito de frango, em saco plástico esterilizado. A mistura foi homogeneizada por aproximadamente 120 segundos em homogeneizador ("Stomacher 80 Laboratory Blender Seward"). Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Alíquotas de 0,1 mL foram pipetadas das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV - OXOID® CM669) e 1,0 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Selenito-Cistina (SC - MICROMED® 2087). Os tubos foram incubados a 41°C ± 0,5°C, sob agitação mecânica constante de água por 24 horas.

Para o isolamento, cada cultivo nos caldos de enriquecimento foi semeado, utilizando-se alça de platina, sobre a superfície de quatro meios seletivos em duplicata e cultivados em estufa a 37°C por 24 horas. Como meio de alta

[Digite texto]

seletividade foi utilizado o ágar *Salmonella* Diferencial Modificado – meio RajHans (SDM - HIMEDIA® M1078) e o ágar base Verde Brilhante modificado (VBM - HIMEDIA® M016). Como meio de média seletividade foi utilizado o ágar *Salmonella-Shigella* (SS - MICROMED® 2043) e como meio de baixa seletividade foi empregado o ágar MacConkey (MC - HIMEDIA® M1024).

Para a triagem das colônias, foram selecionadas três colônias por placa, conforme características morfocoloniais típicas de *Salmonella* spp. nos diferentes meios sólidos utilizados (QUADRO 1). Cada colônia foi semeada em ágar Três-açúcares-ferro (“Triple Sugar Iron”. TSI - HIMEDIA® M021) e em ágar Lisina-ferro (“Lisine Iron Agar” - LIA, HIMEDIA® M377) e incubados a 37°C por 24 horas.

QUADRO 1 Características morfocoloniais típicas de *Salmonella* spp em diferentes meios sólidos

Meios de plaqueamento	Características da colônia típica de <i>Salmonella</i> spp.
SDM	Colônias com coloração vermelha
VBM	Colônias róseas e meio avermelhado
SS	Colônias incolores com ou sem o centro preto em meio amarelo pardo
MC	Colônias translúcidas em meio amarelado

Fontes: RAMBACH, 1990; MOATS; KINNER, 1974; TAYLOR; SCHELHART, 1971; WALTMAN, 2000.

Os cultivos compatíveis com as características bioquímicas de *Salmonella* spp. (QUADRO 2) foram repicados em caldo BHI e incubados a 37°C por 18 a 24 horas para a execução dos testes bioquímicos complementares.

QUADRO 2 Características bioquímicas de *Salmonella* spp. nos meios de triagem ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) e “Lysine Iron Agar” (LIA).

Meios de Triagem	Características do crescimento de <i>Salmonella</i> spp.
TSI	Superfície do bisel vermelha e fundo amarelo e preto
LIA	Superfície do bisel violeta e fundo violeta e preto

Fonte: HAJNA, 1945; JOHNSON et al., 1966

[Digite texto]

Como testes bioquímicos, foram realizadas as provas de Urease, Sulfeto-indol-motilidade (SIM) e Desaminação da fenilalanina. Os cultivos com características de *Salmonella* spp. (QUADRO 3) foram confirmadas sorologicamente.

QUADRO 3 Características bioquímicas de *Salmonella* spp. nos meios caldo Uréia, Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) e ágar Fenilalanina.

Comportamento bioquímico de <i>Salmonella</i> spp.		
Teste bioquímico	Resultados	
Urease	Manutenção da cor inicial do meio.	
Meio SIM	Produção de H ₂ S	Precipitado negro.
	Teste de Indol	A adição do reativo de Kovac's forma anel cuja coloração não se altera.
	Motilidade	Difusão do crescimento por todo o meio.
Desaminação da fenilalanina	A adição de solução de cloreto férrico 10% não altera a coloração do mesmo.	

Fonte: ANDREWS; HAMACK, 1998; BRASIL, 2003

Para a sorologia, foi utilizado anti-soro polivalente "O" (Probac do Brasil®). Para isto, foram depositados sobre a superfície da placa de Huddleson, uma gota da suspensão do cultivo em ágar TSI, e adicionados uma gota de soro anti-salmonela polivalente "O" e uma gota de solução salina 0,1%. Após homogeneização da mistura, foi procedida a leitura com iluminação sobre fundo escuro.

Os resultados obtidos no isolamento e identificação de *Salmonella* spp. nas amostras artificialmente contaminadas foram comparados entre si quanto ao desempenho dos meios de enriquecimento associados aos meios de plaqueamento.

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Seguida a incubação por 24 horas da etapa de pré-enriquecimento, procedeu-se à extração do DNA das amostras pelo método do fenol-clorofórmio segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Desse modo, alíquotas de um microlitro de cada amostra foram transferidas para microtubos de polipropileno de 1,5 µL. As

[Digite texto]

amostras foram então centrifugadas por 20 minutos a 13.500 rpm, a 10°C, em centrífuga refrigerada (“Thermo Electron Corporation PK121R”) e o sobrenadante descartado, utilizando-se o sedimento de cerca de 40 µL. Ao sedimento foram adicionados, 400µL de tampão Tris-EDTA dextrose, 30 µL de proteinase K e 30 µL de sódio dodecil sulfato (SDS) a 10%. As amostras foram então colocadas em bloco térmico por 30 minutos, a uma temperatura de 50°C a 55°C, e, em seguida, banhadas em gelo por cinco minutos. Após isto, foram adicionados 500 µL de fenol tamponado, pH 8,0, às amostras que foram então homogeneizadas por inversão suave por 10 minutos e levadas à centrífuga refrigerada a 10°C por 30 minutos em rotação de 13.500 rpm. A fase superior foi transferida para novo microtubo, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e homogeneizadas por três minutos. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 13.500 rpm por cinco minutos, a 10°C, e a fase superior foi colocada em novo microtubo. Foi adicionado o dobro do seu volume em álcool etílico e as amostras foram mantidas a -20°C “overnight”. Transcorrido este período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, em 13.500 rpm, a 10°C e o álcool descartado e após a secagem dos tubos, as amostras foram ressuspensas em 100 µL de tampão Tris-EDTA, pH 8,3, para que fossem armazenados em freezer a -20°C até o momento da realização da PCR.

Foi utilizado um par de “primer” que amplifica 284 pares de base, com a sequência de oligonucleotídeos derivada do gene *invA*, como se segue (RAHN et al., 1992):

5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3'

5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'

Foi preparada a reação de 21 µL contendo 5 µL de tampão 10x, 5 µL de MgCl₂, 5 µL de dNTP mix (25 µM de cada), 100 pmol de cada *primer*, 2U de taq DNA polimerase e 2 µL de DNA purificado. O ciclo programado em termociclador (“Thermo Electron Corporation PX2 Thermal Cycler”) foi desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 54°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por sete minutos. O resultado da reação foi obtido por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O Teste Exato de Fischer foi aplicado na análise dos resultados gerais de detecção de *Salmonella* spp. pelos dois métodos testados e o teste do Qui-quadrado foi utilizado na comparação do desempenho dos meios de enriquecimento na recuperação de *Salmonella* spp. em amostras artificialmente contaminadas.

4 RESULTADOS

Foram recuperadas 97% de *Salmonella* spp. pelo método convencional em 34 amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*, a partir das características morfocoloniais observadas nos diferentes meios de cultivo (Figuras 1, 2, 3 e 4), nos meios de triagem (Figura 5) e na confirmação pelas provas bioquímicas (Figuras 7, 8 e 9) e sorológicas, e 100% pela PCR (Figuras 11 e 12).

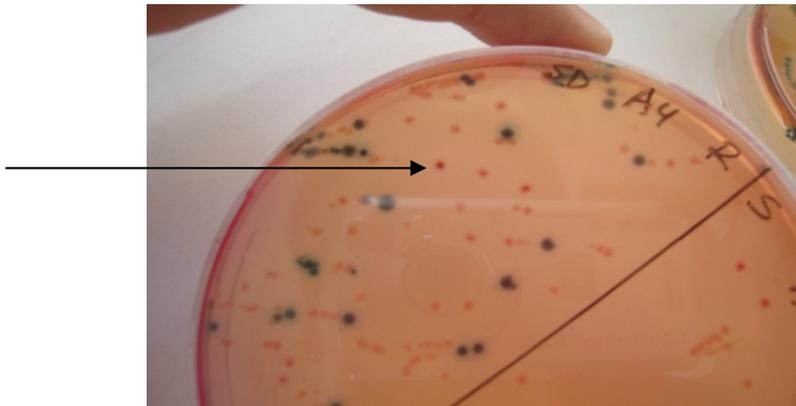


FIGURA 1 Cultivo em ágar *Salmonella* Diferencial Modificado. Colônias vermelhas são compatíveis com características de *Salmonella* spp. (seta).

[Digite texto]

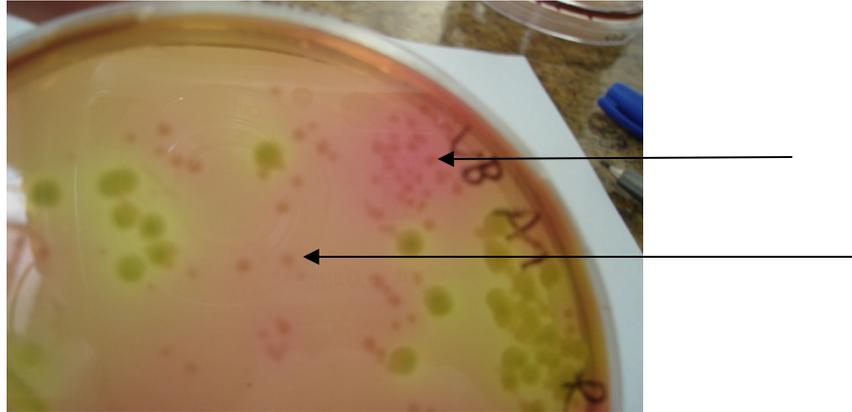


FIGURA 2 Cultivo em ágar Verde-Brilhante Modificado. Colônias rosas são compatíveis com características de *Salmonella* spp. (setas).

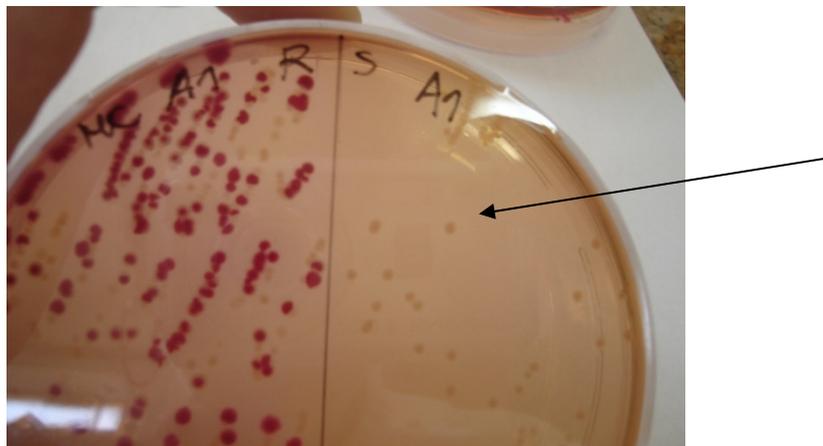


FIGURA 3 Cultivo em ágar MacConkey. Colônias translúcidas compatíveis com características de *Salmonella* spp. (seta)

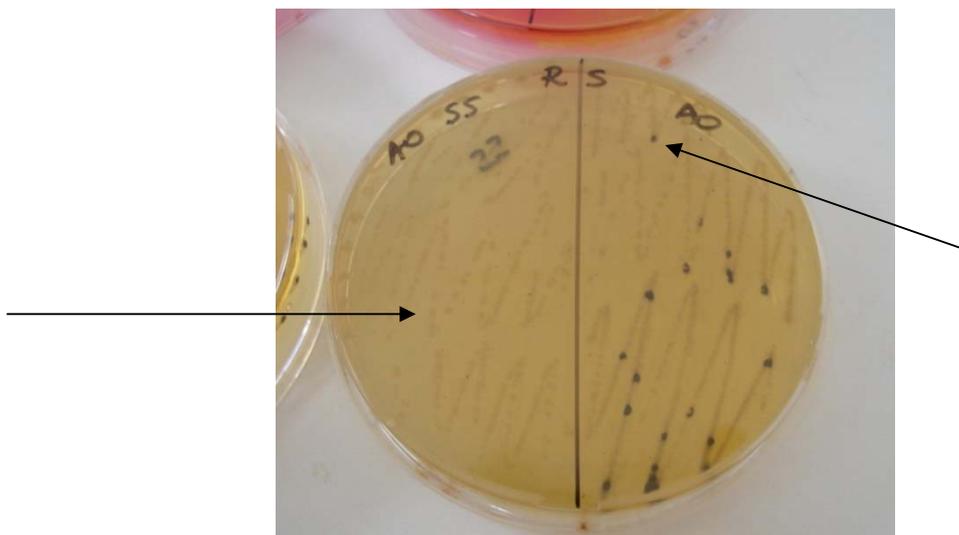


FIGURA 4 Cultivo em ágar *Salmonella-Shigella*. Colônias incolores com ou sem centro preto compatíveis com características de *Salmonella* spp. (setas)

[Digite texto]

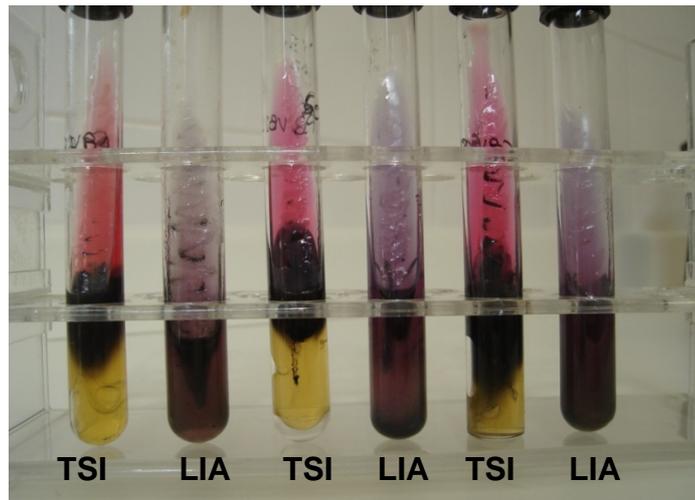


FIGURA 5 Cultivo em ágar “Triple Sugar Iron” (TSI) e ágar “Lysine Iron Agar” (LIA). Comportamentos bioquímicos compatíveis com *Salmonella* spp.

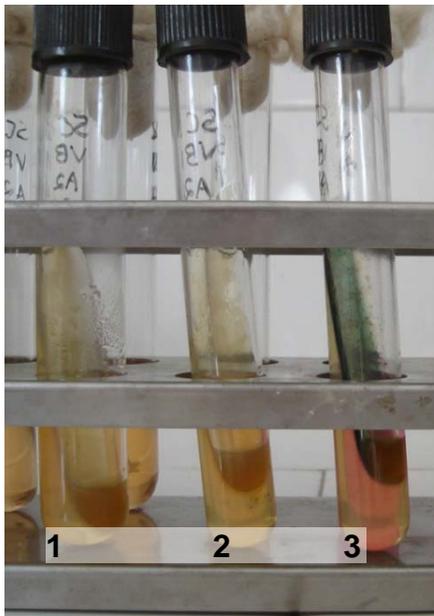


FIGURA 6 Cultivo em ágar Fenilalanina no teste bioquímico da Desaminação da Fenilalanina. 1 e 2 negativos para o teste, característicos de *Salmonella* spp.; 3 positivo.



FIGURA 7 Cultivo em caldo uréia no teste bioquímico da Urease. 1 amostra urease positiva; 2 urease negativa, característica de *Salmonella* spp.

[Digite texto]



FIGURA 8 Cultivos em meio sulfeto-indol-motilidade (SIM) no teste bioquímico SIM. 1 e 2 produção de sulfeto, indol negativo, com motilidade; 3 e 4 sulfeto negativo, indol negativo, sem motilidade.

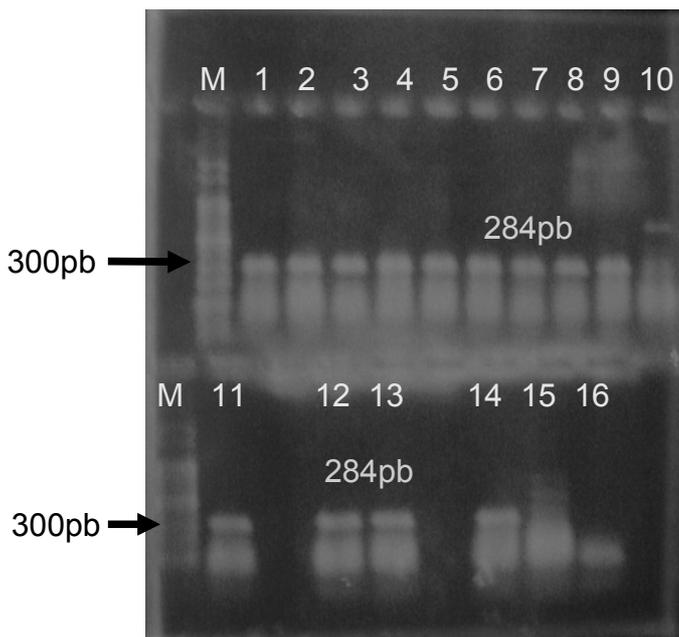


FIGURA 9 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. M. Marcador de DNA de 100pb, 1 controle positivo, 2 a 9 e 11 a 14 amostras positivas; 10 e 16 controles negativos; 15 amostra não inoculada com *S. Enteritidis* (controle).

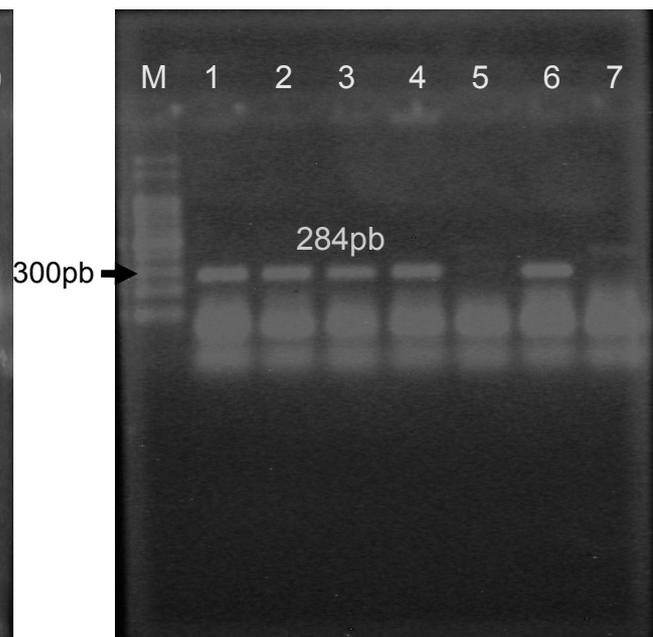


FIGURA 10 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. M Marcador de DNA de 100pb, 1 a 4 amostras positivas; 6 controle positivo; 7 controle negativo; 5 amostra não inoculada com *S. Enteritidis* (controle).

Na análise das 31 amostras de campo, duas amostras foram positivas no método de isolamento convencional, porém esse resultado não foi confirmado na PCR (FIGURA 11). A frequência de detecção de *Salmonella* spp. nos dois métodos testados estão dispostos na Tabela 1.

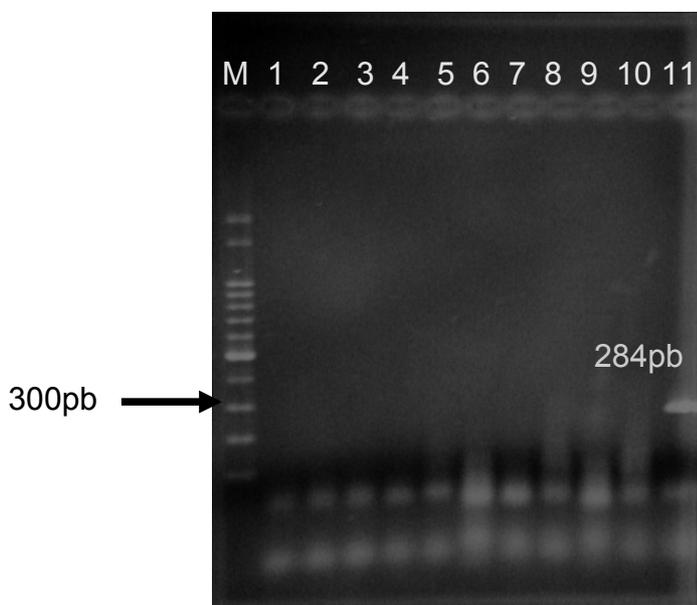


FIGURA 11 Fotografia do gel de agarose com os produtos da PCR de amostras de campo. M. Marcador de DNA de 100pb, 1 a 10 amostras negativas; 11 controle positivo

TABELA 1 Frequência de detecção de *Salmonella* spp. pela PCR e pelo método convencional em amostras de peito de frango contaminadas artificialmente e em amostras de campo*

Métodos utilizados	Amostras contaminadas artificialmente	Amostras de campo
PCR	34/34 (100%)	0/31
Método Convencional	33/34 (97%)	2/31 (6,45%)

*Teste exato de Fischer, IC=95%, $p < 0,05$

Apesar de não haver diferença estatística entre os dois métodos na análise isolada das amostras contaminadas artificialmente e nas amostras de campo, pelo teste exato de Fischer, os resultados gerais diferiram entre si, com $p = 0,0291$. Portanto, houve diferença significativa entre as proporções observadas nos dois tipos de amostras, contaminadas artificialmente e amostras de campo, respectivamente. No entanto, o índice *Kappa* calculado foi 0,05, logo a concordância entre os dois métodos testados foi fraca.

[Digite texto]

Analisando os desempenhos dos caldos de enriquecimento e dos meios de plaqueamento na recuperação de *Salmonella* spp., a melhor combinação caldo-meio foi SC combinado ao meio SDM, que obteve um percentual de 91,17% de isolamento de *Salmonella* spp. Apesar disso, pelo teste do Qui-quadrado, os resultados não foram estatisticamente significativos. A comparação entre os meios de plaqueamento a partir dos caldos de enriquecimento pode ser observada na Tabela 2, que apresenta os resultados positivos por amostras testadas.

TABELA 2 Comparação entre meios de enriquecimento e meios sólidos na recuperação de *Salmonella* spp. em amostras de peito de frango inoculadas com *S. Enteritidis*. Total de resultados positivos por amostra*

	MC	SS	SDM	VBM	Total
RV	21/34 (61,76%)	23/34 (67,64%)	21/34 (61,76%)	19/34 (55,88%)	84/136 (61,76%)
SC	23/34 (67,64%)	23/34 (67,64%)	31/34 (91,17%)	22/34 (64,70%)	99/136 (72,79%)
Total	44/68 (64,70%)	46/68 (67,64%)	51/68 (75%)	41/68 (60,29%)	

*Qui-quadrado, IC=95%, (p>0,05)

5 DISCUSSÃO

Tanto o método convencional quanto a PCR foram capazes de detectar *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente. Nas amostras de campo somente pelo método convencional foi possível a detecção de *Salmonella* spp. O melhor desempenho do método convencional, principalmente nas amostras de campo, deve-se provavelmente ao número superior de bactérias competitivas nas amostras resfriadas, visto que nas análises em amostras artificialmente contaminadas foram utilizadas amostras congeladas e seus controles, não inoculados, não apresentaram resultados positivos. Dickel (2004) realizou análise semelhante, onde comparou as técnicas de PCR e ELISA com o método convencional para detecção de *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Gallinarum* (SG) e *S. Pullorum* (SP) em carne de frango. As amostras foram contaminadas artificialmente com diluições de 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} para SE e ST e 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para SG e SP. A PCR obteve melhor resultado, com 75% (225/300) de recuperação de amostras contaminadas por *Salmonella* artificialmente, seguido da técnica de ELISA, que recuperou 71% (213/300) e o método convencional obteve 56,67% (170/300) de recuperações. Quando testadas a campo, em três tipos de matadouros, o método convencional obteve melhor desempenho, com 26% (47/180) amostras positivas, seguido de ELISA, com 17,8% (32/180) e PCR, com 12,2% (22/180). Estes resultados corroboram os obtidos no presente estudo.

Muitos trabalhos têm provado que a PCR é mais sensível que o método convencional (BENNETT et al., 1998; LÖFSTRÖM, 2004; MYINT et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002; VON RÜCKERT, 2006), mas a sensibilidade e especificidade da PCR são bastante variáveis e há autores que concluem que a sensibilidade da PCR se assemelha à sensibilidade do método convencional, o que concorda com os resultados obtidos no presente estudo. Croci et al. (2004) também compararam a

PCR e ELISA com o método convencional em amostras contaminadas artificialmente em pequena quantidade e analisadas em diferentes momentos durante o pré-enriquecimento. Observaram que tanto a PCR, quanto o ELISA foram tão sensíveis quanto o método convencional após cinco horas de pré-enriquecimento. Da mesma maneira, Löfström et al (2008) compararam, como parte de um estudo de validação, a PCR e o método convencional preconizado pelo Comitê Nórdico de Análises de Alimentos (“Nordic Committee on Food Analyses”, NMKL-71), para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos destinados a animais. Foram estudadas amostras contaminadas artificialmente e amostras naturalmente contaminadas e como resultado não encontraram diferenças significativas entre os dois métodos.

A frequência de detecção de *Salmonella* spp. pela PCR equiparou-se à frequência obtida pelo método convencional no presente estudo e isto pode ter sido influenciado pelo uso de amostras pré-enriquecidas na PCR, como demonstraram Oliveira et al. (2003). Estes autores compararam a PCR a partir de amostras pré-enriquecidas e amostras enriquecidas em caldo RV com o método convencional. Utilizaram amostras de suabes, vísceras, mecônio e ração para frangos. Como resultados, detectaram mais amostras positivas para *Salmonella* spp. pela PCR do que pelo método convencional quando utilizadas amostras enriquecidas. Entretanto, com amostras pré-enriquecidas o método convencional foi mais eficiente que a PCR. Myint et al. (2006) realizaram estudo semelhante em amostras de carne de frango resfriadas e também obtiveram melhores resultados na PCR de amostras enriquecidas em dois caldos de enriquecimento em detrimento das amostras pré-enriquecidas.

Em amostras artificialmente contaminadas, constatou-se, na PCR, que aquelas usadas como controle, ou seja, aquelas que não foram contaminadas artificialmente apresentaram bandas de amplificação inespecíficas, que, neste caso, são bandas fracas com tamanho distinto de 284pb. O par de “primers” de sequência do gene *invA* utilizado pode ter promovido interação com outras bactérias não-salmonelas presentes nas amostras, conforme relatado por Rahn et al. (1992) e Santos et al. (2001a). Em seu estudo, Rahn et al. (1992) também observaram bandas semelhantes em estudo cujo objetivo foi testar sequências do gene *invA* como alvo de PCR para a detecção de *Salmonella* em amostra contendo um grupo de cepas bacterianas. Foram analisadas 630 amostras de *Salmonella* com mais de

[Digite texto]

100 sorovares e os controles consistiam de 142 cepas de bactérias não-salmonelas. Todas as amostras de *Salmonella* foram detectadas, com exceção de duas amostras de *S. Litchfield* e *S. Senftenberg* e todas as amostras não-salmonelas. Da mesma forma que o presente estudo, 33 cepas de 142 cepas de bactérias não-salmonelas testadas produziram ampliações inespecíficas. Santos et al. (2001a) utilizaram o mesmo par de primer utilizado neste estudo e tiveram como resultado uma amostra de *Escherichia coli* com banda de amplificação inespecífica, porém facilmente distinguível de *Salmonella* spp.

Em relação à comparação entre as diferentes combinações de caldos de enriquecimento e meios sólidos seletivos utilizados no método convencional, o caldo SC permitiu melhores resultados na recuperação das colônias de *Salmonella* spp. em comparação ao caldo RV. Nascimento et al. (2000) realizaram estudo para comparar os caldos de enriquecimento RV, SC e Tetrionato (TT) adicionados do antimicrobiano novobiocina, e os meios sólidos, Hektoen (HE), MC, SS, VB e ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), no isolamento de *Salmonella* spp. em 50 carcaças de frango e fezes de aves. O melhor desempenho nos isolamentos a partir do uso do caldo SC em detrimento de RV está de acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa. Embora não tenham havido diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diferentes caldos e meios para isolamento, foi observada maior recuperação de *Salmonella* spp. na combinação SC com o meio de maior seletividade em ambos os trabalhos.

Gelli, Ristori e Buzzo (2003) também estudaram a eficiência dos meios de enriquecimento e de plaqueamento no isolamento de *Salmonella* spp., utilizando uma cepa de *S. Typhimurium* e uma mistura de cultivos de cepas de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* para simular a existência de bactérias interferentes. Foram testados os caldos RV e SC, a 35°C e a 42°C, e os meios de plaqueamento SS, VB e ágar Bismuto de Sulfito (BS). Nesse sentido, observaram que o caldo RV apresentou melhor desempenho nos três meios de plaqueamento quando incubado à temperatura de 35°C, mas a 42°C demonstrou resultados semelhantes ao caldo SC. Na pesquisa atual, o caldo SC obteve ligeira vantagem no isolamento de *Salmonella* spp. em relação ao caldo RV, mesmo com incubação a 42°C para ambos.

[Digite texto]

Com relação aos meios de plaqueamento, o ágar SDM foi utilizado neste trabalho porque apresenta composição semelhante ao ágar Rambach, garantindo elevada seletividade à *Salmonella* spp. com a vantagem de ter custo inferior ao Rambach. Apresenta, entre outros componentes, deoxicolato de sódio que inibe o crescimento de bactérias Gram positivas e propilenoglicol, no qual *Salmonella* spp. reage, acidificando o meio, que pode ser visualizado pela viragem do indicador cromogênico de β -galactosidase, produzindo colônias rosas, o que permite diferenciação de *Salmonella* spp. de *Proteus* spp. e de outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (RAMBACH, 1990). Os meios de enriquecimento e de plaqueamento têm eficácia comprovada em muitos trabalhos, mas com grandes variações de resultados quanto às combinações caldos-meios de plaqueamento. Nesse sentido, o uso de dois ou mais caldos de enriquecimento e meios para plaqueamento implica em melhores resultados quanto ao isolamento e identificação de *Salmonella* spp. No presente estudo a melhor combinação para o isolamento de *Salmonella* spp. foi a utilização de SC no enriquecimento e SDM no plaqueamento, tanto a partir de amostras contaminadas artificialmente como de amostras de campo.

Com referência ao tempo demandado de análise nos dois métodos, os resultados da PCR foram obtidos em cerca de dois dias desde a obtenção das amostras de campo, o que está de acordo com Santos et al. (2001a) e Von Rückert (2006), e em três dias após a obtenção e preparo das amostras artificialmente contaminadas, conforme Dickel (2004) também encontrou. No método convencional, os resultados foram concluídos em seis a sete dias nas amostras de campo, e em até oito dias, nas amostras artificialmente contaminadas. A PCR obteve vantagem em relação ao método convencional quanto ao período de tempo para a obtenção dos resultados, além de ter sido um método tão eficiente quanto o método convencional na detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango.

6 CONCLUSÕES

- A PCR foi tão eficiente quanto o método convencional de isolamento na detecção de *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente.
- O método de isolamento convencional foi mais eficiente que a PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de campo.
- O caldo Selenito-Cistina proporcionou melhores resultados no isolamento de *Salmonella* spp. quando comparado ao caldo Rappaport-Vassiliadis.
- A combinação do caldo de enriquecimento Selenito-Cistina com o meio sólido *Salmonella* Diferencial Modificado obteve maior frequência de isolamentos de *Salmonella* spp. na aplicação do método convencional do que as combinações de Selenito-Cistina com os meios *Salmonella-Shigella*, MacConkey ou Verde Brilhante Modificado e Rappaport Vassiliadis com todos os meios de plaqueamento testados.
- A PCR proporcionou resultados com maior rapidez que a técnica de isolamento convencional.

[Digite texto]

7 OBRAS CITADAS

AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SØRENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, v.7, p.171-178, 1993.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. United States Food and Drug Administration (FDA). Center for Food Safety. *Bacteriological Analytical Manual Online*, 8ed. rev., , cap.5, 1998. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Acesso em: 06 fev. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS – ABEF. *Estatísticas*. Disponível em: <http://www.abef.com.br/Estatisticas>. Acesso em: 28 de janeiro de 2009.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.31, n.2, p.303-307, 2001.

BENNETT, A. R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J. G.; BETTS, R. P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p. 437-441, 1998.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Saúde Aviária e Doenças. In: ANDREATTI FILHO, R. L. *Salmoneloses Aviárias*. São Paulo: Roca, 2006, seção 2, cap.9, p.84-111.

BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5., 2006, *Anais...* Santa Maria, RS, 2006, p.90-94.

BLACKBURN, C. W. A review, rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in food. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, n.75, v.3. p.199-214, 1993.

[Digite texto]

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14309, 22 set. 1994, Seção 1.

_____. _____. Portaria nº8, de 23 de janeiro de 1995. Aprova as alterações introduzidas no método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* conforme normas anexas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.1182, 27 jan. 1995, Seção 1, 1995a.

_____. _____. Portaria nº126, de 03 de novembro de 1995. Aprova as “Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*)”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.17694, 06 nov. 1995, Seção 1, 1995b.

_____. _____. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003, Seção 1, 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.7-E, p.45-53, 10 jan. 2001, Seção 1.

_____. _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº39, de 08 de fevereiro de 2002. Estabelece a data de 02 de julho de 2002 para o integral cumprimento da RDC nº13, de 02 de janeiro de 2001, a qual aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 13 fev. 2002.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p., Normas e Manuais Técnicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso em: 29 jan. 2009.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. *Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2009.

[Digite texto]

BUZBY, J. C.; ROBERTS, T.; LIN, C. T. J.; MACDONALD, J. M. Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses. In: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Economic Research Centre. *Publications*. 1996. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Publications/AER741/>. Acesso em: 02 fev. 2009.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, M. B. M.; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p., cap.43, p. 319-328.

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

CENTERS FOR DISEASE, CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Disease Listing (Typhoid Fever)*. out. 2005. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/typhoidfever_t.htm. Acesso em: 22 jan. 2009.

_____. *Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks: United States, 1998-2002*. nov. 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>. Acesso em: 22 jan. 2009.

COHEN, N. D.; MC GRUDER, E. D.; NEIBERGS, H. L.; BEHLE, R. W.; WALLIS, D. E.; HARGIS, B. M. Detection of *Salmonella* Enteritidis in feces from poultry using booster Polymerase Chain Reaction and Oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. *Poultry Science*, Texas, EUA, v.73, p.354-357, 1994.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESHI, G. Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied and Environmental Microbiology*, Roma, Itália, v.70, n.3, p.1393-1396, 2004.

DICKEL, E. L. *Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de (Salmonella) em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate*. Porto Alegre, 2004. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. LOPES, R. F. F.; WALD, V. B.; BARBOSA, T. M. C.. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da Reação em Cadeia da Polimerase. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.33, n.3, maio 2003.

[Digite texto]

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, p. 567-583, 2003. Seção 2, cap. 16. CD-ROM.

GELLI, D. S.; RISTORI, C. A.; BUZZO, A. A. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.3, n.62, p.159-164, 2003.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Collaborating Centre for Reference and Research on (Salmonella)*, 9ed., 2007. Disponível em: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf. Acesso em: 20 jan. 2009.

HAJNA, A. A. Triple Sugar Iron agar medium for identification of the intestinal group of bacteria. *Journal of Bacteriology*, v.5, n.49, p.516–517, 1945.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. R. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.2, p. 55-62, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9ed. Ed. Holt, J. G. Baltimore, Maryland. Williams e Wilkins, v.1, 1994.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6ed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2005.

JOHNSON, J. G.; KUNTZ, L. J.; BARON, W.; EWING, W. H. Biochemical differentiation of the *Enterobacteriaceae* with the aid of lysine-iron-agar. *Applied Microbiology*, v.14, n.2, p.212-217, 1966.

LÖFSTRÖM, C.; KNUTSSON, R.; AXELSSON, C. E.; RÅDSTRÖM, P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, Lidköping, Suécia, v.70, n.1, p. 69-75, 2004.

LÖFSTROM, C., AXELSSON, C. E. C., RÅDSTRÖM, P. Validation of diagnostic PCR method for routine analysis of *Salmonella* spp. in animal feed samples. *Food Analysis Methods*, v.1, p. 23-27, 2008.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of food borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, n.83, p. 39-48, 2003.

[Digite texto]

MOATS, W. A.; KINNER, J. A. Factors Affecting Selectivity of Brilliant Green-Phenol Red Agar for *Salmonella*. *Applied microbiology*, EUA, v.27, n.1, p. 118-123, 1974.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Anais...In: COLD SPRING HARBOUR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY*, 1986, v. LI.

MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*, EUA, n. 23, p. 599-604, 2006.

NASCIMENTO, M. S.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparação de Meios de Enriquecimento e de Plaqueamento Utilizados na Pesquisa de *Salmonella* em Carcaças de Frango e Fezes de Aves. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v.2, n.1, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516635X2000000100012&script=sci_arttext&lng=pt. Acesso em: 28 jan. 2009

OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, L. R.; SCHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B.; SALLE, C. T. P.; CANAL, C. W. Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*. Porto Alegre, v.87, p.25-35, 2002.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, Porto Alegre, RS. v.36, p. 217-221, 2003.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. *Publicación científica y técnica*. 3ed., v.1, n.580, p. 240-253, 2003.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Revista de Saúde Pública*, v.5, n.32, p.477-483, 1998.

PERSING, D. H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. *Journal of Clinical Microbiology*, Minesota, EUA, v.29, n.7, p.1281-1285, jul. 1991.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; MC EWEN; GALLAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of na *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, Londres, v.6, p.271-279, 1992.

[Digite texto]

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.1, p. 301-303, jan. 1990.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n.5, p.247-250, set. 2001a.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, RS, v.29, n.2, p.87-92, nov. 2001b.

SHINOHARA, N. K. S. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F. D.; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência e saúde coletiva*, Rio de Janeiro, RJ, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.2, p. 85-100, ago. 2002.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38, n.2, abril. 1996.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, D. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n.5, p. 315-322, 1996.

TAYLOR, W. I.; SCHELHART, D. Isolation of *Shigella*: Comparison of Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Hektoen Enteric Agar, *Salmonella-Shigella* Agar, and Eosin Methylene Blue Agar with Stool Specimens. *Applied Microbiology*, EUA, v.21, n.1, p. 32-37, 1971.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA) *Relatório Anual 2007-2008*. Disponível em: www.uba.org.br. Acesso em: 19 jan. 2009.

[Digite texto]

VON RÜCKERT, D. A. S. *Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de (Salmonella) spp. em frangos de corte durante o abate.* Viçosa, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2006.

WALTMAN, W. D. Methods for the cultural isolation of Salmonella. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in Domestic Animals.* Cabi Publishing, 2000, 463p., cap. 21, p. 355-372.

8 OBRAS CONSULTADAS

ABREU, E. S.; TEIXEIRA, J. C. A. *Apresentação de Trabalhos Monográficos de Conclusão de Curso*, 9ed. rev. amp. Niterói: Editora da Universidade Federal Fluminense – EDUFF, 2007. 90p.

FERREIRA, A. J. P.; BRAGA, G. B.; MORENO, E. S.; MARTINS, L. M.; PEDROSO, A. C.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S. Estudo comparativo de diferentes meios de cultivo no isolamento de *Salmonella* Enteritidis. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, p.206, 2007. Prêmio Lamas. Suplemento 9.

FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; SANTOS, L. R.; PONTES, A. P.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Métodos de extração de DNA para detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v.31, n.2, p.315-318, 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182 p., 1996.

LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L.; GONÇALVES, G. A. M.; OKAMOTO, A. S. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* Enteritidis em produtos avícolas artificialmente contaminados. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, p.236, 2007. Prêmio Lamas. Suplemento 9.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. In: Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.5, p.607-625, 1999. Disponível em: <http://ftp.cdc.gov/pub/EID/vol5no5/ascii/mead.txt>. Acesso em: 04 fev. 2009.

PAIVA, J. B.; STERZO, E. V.; RIBEIRO, S. A.; PEREIRA, E. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.73, n.3, p.263-269, 2006.

PEREIRA, M. G. *Epidemiologia Teoria e Prática*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 596p.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; SALVAT, G.; COLIN, P. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Letters in Applied Microbiology*, Ploufragan, França, v.24, p.113-116, 1997.

9 APÉNDICE

9.1 ESQUEMA DO MÉTODO CONVENCIONAL DE ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.

