



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLA  
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SP. E  
DOS SOROTIPOS TYPHI, ENTERITIDIS E  
TYPHIMURIUM POR EM CARÇAÇAS E MIÚDOS DE  
AVES COMERCIALIZADOS NO DISTRITO  
FEDERAL**

**CAMILA GUIMARÃES DE FREITAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA / DF  
DEZEMBRO / 2008**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLA  
PARA A DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP. E DOS  
SOROTIPOS TYPHI, ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM  
EM CARCAÇAS E MIÚDOS DE AVES  
COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

**CAMILA GUIMARÃES DE FREITAS**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO:009/2008**

**BRASÍLIA / DF  
DEZEMBRO / 2008**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLA PARA A DETECÇÃO DE  
SALMONELLA SP. E DOS SOROTIPOS TYPHI, ENTERITIDIS E  
TYPHIMURIUM EM CARÇAÇAS E MIÚDOS DE AVES COMERCIALIZADOS  
NO DISTRITO FEDERAL**

**009/2008**

**CAMILA GUIMARÃES DE FREITAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

**APROVADA POR:**

---

**Ângela Patrícia Santana, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Universidade de Brasília**

---

**Márcia de Aguiar Ferreira, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Universidade de Brasília**

---

**Cristiano Sales Prado, Prof. Dr. Universidade Federal de Goiás.**

**BRASÍLIA/DF, 15 de DEZEMBRO de 2008.**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FREITAS, C.G. Adaptação da técnica de PCR múltipla para a detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 65 p. Dissertação de Mestrado.

**Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

FREITAS, Camila Guimarães de

Adaptação da técnica de PCR múltipla para a Detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal; orientação de Ângela Patrícia Santana, 2008. 65 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Microbiologia de Alimentos. 2. Biologia Molecular. 3. PCR 4. Identificação de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium. I. Santana, A.P. II. Adaptação da técnica de detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium por em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

Camila Guimarães de Freitas

CPF: 001.899.941-77

CRMV 1946

[kmlaqf@gmail.com](mailto:kmlaqf@gmail.com)

À minha família, ao meu namorado, aos meus  
amigos e companheiros de bancada pelo  
apoio e compreensão.  
Aos professores, técnicos e pessoal de  
apoio que ajudaram na minha formação  
profissional.

## **Agradeço**

A Deus, que permeia todos os acontecimentos em minha vida, por fazer de mim uma pessoa saudável e curiosa.

Ao meu querido e amado pai, por tudo que representa em minha vida.

A minha mãe, que acreditou em mim desde o princípio, por me apoiar incondicionalmente em minhas decisões e por seu amor, carinho, companheirismo. Obrigada de todo o coração, Güirda.

Ao meu irmão, ao avô Guimarães, à avó Maria, à Dinda/ Aninha, ao Eugênio, à Raquel e ao Marcelo por toda atenção, carinho e compreensão.

Ao Alexandre, companheiro de todas as horas e grande entusiasta do meu sucesso, por me conquistar diariamente com seu amor tão especial em minha vida.

À Maria Augusta pelo apoio técnico e companheirismo e ao Lucas por me entreter com seu jeito “anjolescente”.

À Letícia, guerreira e amiga do peito e à sua família tão receptiva.

À professora, orientadora e conselheira Ângela Patrícia Santana, por acreditar em meu potencial e cultivá-lo com sua experiência.

Ao colega Rafael Andrade pelas conversas de bancada e por todo o apoio.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – LAMAL (Narina, Pat House, Pâmela Sucesso, Helenira, Liana, Fernanda, Anderson), ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Clínica (Hudson, Vinícius e Cláudia) e ao pessoal de apoio (Dino, Léo e Cleilson) por todo apoio e aprendizado que me proporcionaram.

À querida Claudinha, companheira de longas e reflexivas conversas, por me ajudar a crescer.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UnB, especialmente a todos do LAB 2, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e ampliar minha visão da pesquisa científica. Em especial Fátima e Ivônildes, sempre atentas. Ao Fernando Araripe por abrir as portas da Biomol.

Aos professores pelo desvelo e dedicação em lapidar e otimizar minhas habilidades intelectuais, em especial ao Vítor, à Márcia, à Simone, à Débora e à Arlete. Muito obrigada!

Aos meus queridos animais que, com lambidas, latidos, miados, mordidas, arranhões e brincadeiras, sempre estiveram ao meu lado, ajudando-me a desenvolver a humildade, a paciência, a humanidade e o amor incondicional.

*“Ex nihilo nihil”*

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE QUADROS</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2. Justificativa</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>18</b>
3.1. Gerais	18
3.2. Específicos	18
<b>4. Revisão de Literatura</b>	<b>19</b>
4.1. Caracterização da bactéria	19
4.2. Fatores de virulência e patogenia	21
4.3. Salmonelose e saúde pública	22
4.3.1. Epidemiologia	22
4.3.2. A doença no homem	22
4.3.3. Doença nas aves	24
4.3.3.1. Sistema de criação das aves	25
4.4. Impacto econômico e legislação	25
4.5. Métodos de pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. em alimentos de origem animal	28
4.5.1. Microbiologia tradicional	28
4.5.2. Biologia Molecular como ferramenta de diagnóstico	31
4.5.2.1. Princípios da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31



<b>5.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>33</b>
5.1.	Obtenção dos controles positivos	33
5.2.	Extração de DNA total dos controles positivos	33
5.3.	PCR dos controles positivos	34
5.4.	PCR múltipla dos controles positivos	36
5.5.	Contaminação do caldo de carne de aves	36
5.6.	Origem das carcaças e dos miúdos resfriados de aves	37
5.7.	Extração de DNA total das carcaças resfriadas e dos miúdos de aves	37
5.8.	PCR das carcaças e miúdos resfriados de aves	37
5.9.	PCR múltipla das carcaças e miúdos resfriados de aves	37
5.10.	Análise microbiológica carcaças resfriadas e dos miúdos de aves	38
5.11.	Avaliação estatística da ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. em carcaças e miúdos de aves	38
<b>6.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>39</b>
6.1.	Controles positivos	39
6.2.	Extração de DNA total dos controles positivos	39
6.3.	PCR dos controles positivos	40
6.4.	PCR múltipla dos controles positivos	46
6.5.	Contaminação do caldo de carne de aves	47
6.6.	Extração de DNA total das carcaças e miúdos resfriados de aves comercializados no Distrito Federal	50
6.7.	Ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium detectados por PCR, mPCR e por diagnóstico microbiológico tradicional em carcaças resfriadas e miúdos de aves comercializadas no Distrito Federal	50
6.8.	Análise Estatística da ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. em miúdos de aves comercializados no Distrito Federal	53
<b>7.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> spp.	19
Quadro 2: Classificação para as principais espécies de <i>Salmonella</i> sp. pelo esquema de Kauffmann-White	20
Quadro 3 – Produção mundial de carnes de frango, nos principais países produtores, no período de 1999 – 2007** (em mil toneladas)	26
Quadro 4 – Exportação mundial de carne de frango, nos principais países exportadores, no período de 2000 – 2007** (em mil toneladas)	26
Quadro 5 – Consumo mundial da carne de frango, nos principais países consumidores, no período de 2000 – 2007** (em mil toneladas)	27
Quadro 6 – Diferenças bioquímicas entre alguns sorotipos do gênero <i>Salmonella</i>	30
Quadro 7: Microrganismo, gene-alvo, seqüência e tamanho dos fragmentos a serem amplificados	34

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Cepas de <i>Salmonella</i> sp. em Ágar Ferro e Três Açúcares	39
Figura 2: Extração de DNA total dos controles positivos de <i>Salmonella</i> sp.	40
Figura 3: PCR dos controles positivos para o gênero <i>Salmonella</i> e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium	41
Figura 4: Resultado do BLAST do sorotipo Enteritidis após o seqüenciamento automático	42
Figura 5: Resultado do BLAST do sorotipo Typhi após o seqüenciamento automático	43
Figura 6: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero <i>Salmonella</i> e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total de <i>Salmonella</i> sp. como molde.	44
Figura 7: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero <i>Salmonella</i> e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Enteritidis como molde	45
Figura 8: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero <i>Salmonella</i> e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Typhi como molde	45
Figura 9: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero <i>Salmonella</i> e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Typhimurium como molde	46
Figura 10: PCR múltipla para identificação de <i>Salmonella</i> sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium	47
Figura 11: Resultado da mPCR para detecção do gênero <i>Slamonella</i> em caldo de carne de aves previamente contaminados com <i>Salmonella enterica enterica</i> sorotipo Agona	48
Figura 12: Resultado da mPCR para detecção do gênero <i>Salmonella</i> e do sorotipo Enteritidis em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Enteritidis	48
Figura 13: Resultado da mPCR para detecção do gênero <i>Slamonella</i> e do sorotipo Typhi em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Typhi	49
Figura 14: Resultado da mPCR para detecção do gênero <i>Slamonella</i> e do sorotipo Typhimurium em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Typhimurium	49
Figura 15: PCR múltipla para identificação de <i>Salmonella</i> sp. e do sorotipo Enteritidis de miúdos resfriados de aves.	50

Figura 17: Análise da probabilidade de ocorrência de *Salmonella* sp. em miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.

**Adaptação da técnica de PCR para a detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium carnes e miúdos resfriados de aves comercializados no Distrito Federal**

**RESUMO**

As ocorrências de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) aumentam de modo significativo em todo mundo. As bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por toxinfecções alimentares e podem ser fatais. O objetivo deste trabalho foi realizar a verificação da presença de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi, e Typhimurium em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal, tanto pela técnica de PCR múltipla (mPCR) quanto pela análise microbiológica tradicional. Os resultados obtidos demonstram que a mPCR foi capaz de realizar a detecção de *Salmonella* sp. em 2,74% das amostras de miúdos. A identificação do sorotipo Enteritidis ocorreu em 1,37% dos miúdos. Em relação às carcaças, não foram detectadas nenhuma amostra positiva para *Salmonella* sp. pelos dois métodos de diagnósticos. Pela análise microbiológica tradicional também foram identificadas 2,74% das amostras de miúdos positivas para o *Salmonella* sp.. Esta metodologia, entretanto, não foi capaz de diferenciar o sorotipo. A mPCR além de fornecer o diagnóstico em 18h, foi capaz de identificar o sorotipo Enteritidis.

**Palavras-chave:** Pesquisa de *Salmonella* sp., Carnes de aves, Microbiologia de Alimentos, Biologia Molecular, PCR Múltipla, sorotipos de *Salmonella enterica enterica*.

**Adaption of a *Multiplex* PCR technique for the detection of *Salmonella* sp. and its serotypes Enteritidis, Typhi and Typhimurium by in poultry meat commercialized in Distrito Federal**

**ABSTRACT**

The occurrence of food outbreaks increase worldwide. *Salmonella* sp. are responsible for outbreaks and can lead to death. The present work successfully detected *Salmonella* sp. and its serotypes Enteritidis, Typhi and Typhimurium in poultry meat sold in Distrito Federal by *multiplex* PCR (mPCR) technique and also by microbiological traditional tests. The achieved results demonstrate mPCR as a technique capable of detect *Salmonella* sp. in 2,74% of the analyzed viscera samples. The serotype Enteritidis was identified in 1,37% of the viscera. Regarding carcass samples, none of them were positive for *Salmonella* sp.. Microbiological traditional tests were able to detect 2,74% of the positive viscera samples for *Salmonella* sp.. This methodology, however, was not able to detect serotype. The mPCR technique can be performed within 18h and is also able to detect the serotype Enteritidis.

**Keywords:** *Salmonella* sp. research, Poultry meat, Food Microbiology, Molecular Biology, *Multiplex* PCR, *Salmonella enterica enterica*.

## 1. Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são responsáveis pela ocorrência de diarreias e estão associadas a mudanças de hábitos alimentares: maior consumo de produtos industrializados e pré-preparados. O aumento da oferta de serviços informais de alimentação favorece a ocorrência de toxinfecção alimentar já que muitos estabelecimentos não conhecem ou não aplicam as boas práticas de fabricação de alimentos (BPF). A associação desses fatores constitui um desafio ao controle sanitário, ocasionando alterações na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos (DDTHA, 2005).

Dados da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, DTHA/CVE, da Secretaria de Estado da Saúde, SES/SP, mostram que, para o período de 1999 a 2002, cerca de 60% dos surtos de diarreia ocorridos no Estado de São Paulo foram veiculados por alimentos (DDTHA, 2005). Os principais lugares associados à ocorrência de salmoneloses foram domicílios, restaurantes, refeitórios e outros prestadores dos serviços da alimentação.

Dentre os agentes envolvidos nas toxinfecções alimentares estão as bactérias do gênero *Salmonella*. Os países em desenvolvimento são os que apresentam os maiores índices de infecções por enterobactérias devido à deficiência de saneamento básico, pobreza, superpopulação. Em áreas endêmicas, as salmoneloses são responsáveis por cinco por cento dos óbitos (EVEREST *et al.*, 2001).

Os métodos de investigação epidemiológica das DTAs englobam a pesquisa microbiológica e a identificação por técnicas de Biologia Molecular. A pesquisa microbiológica envolve etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivos, testes bioquímicos e sorológicos. A obtenção de um resultado negativo para algum microrganismo suspeito requer cerca de quatro dias e a confirmação de resultados positivos, até 15 dias. A metodologia convencional de diagnóstico apresenta outras limitações uma vez que requer um número de células viáveis suficiente para permitir o seu isolamento (CHAICUMPA *et al.*, 1995). Além disso, variações na morfologia e no perfil bioquímico das colônias, nos diferentes meios descritos na literatura, são fatores que aumentam a margem de erro do diagnóstico microbiológico (CAMPOS, 2005; FACH *et al.*, 1999).

A utilização de técnicas de dessecação, de radiação, de manutenção a baixas temperaturas entre outras, pode não inativar por completo microrganismos presentes nos alimentos. São as chamadas células viáveis não cultiváveis que quando da realização do teste microbiológico, não apresentam condições favoráveis a um crescimento que permita a sua identificação. Entretanto, ao permanecerem em condições favoráveis à sua proliferação podem atingir doses infectantes (FLORESTA, 2006). O uso do diagnóstico molecular, por ter o DNA como alvo, não requer um grande número inicial de bactérias para que o agente possa ser identificado. A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite que milhares de cópias sejam feitas a partir de uma única fita molde de DNA. Para tanto, utiliza-se de oligonucleotídeos específicos para cada microrganismo (FLÔRES *et al.*, 2003).

Atualmente, várias técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para o diagnóstico de bactérias de importância em segurança alimentar e saúde pública. Dentre as técnicas utilizadas destacam-se o uso da PCR, da ribotipagem, eletroforese em campo pulsado e do uso de regiões intergênicas e seqüenciais para a identificação de *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* (DENIS *et al.*, 2008; FUNG, 2002; PEI *et al.*, 2008; STROCKBINE *et al.*, 1991; SURDEANU *et al.*, 2003). A detecção rápida de patógenos envolve ainda o uso da PCR em tempo real (*real time* PCR) para a detecção de *Staphylococcus aureus* e *Yersinia* spp. (ORNSKOV *et al.*, 2008; TSENEVA *et al.*, 2003).

Devido a importância das salmoneloses na Medicina Veterinária e na Saúde Pública, aliado à necessidade de se desenvolver técnicas de diagnósticos mais rápidas e precisas, o presente trabalho propôs-se a detectar o gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium em carcaças e miúdos resfriados de aves comercializadas no Distrito Federal por meio de PCR múltipla.



## 2. Justificativa

A produção de carnes e derivados de aves exige cuidados com a sanidade dos lotes no intuito de garantir a qualidade dos produtos que chegam ao consumidor. Dentre os riscos associados aos alimentos, destacam-se as salmoneloses, cujos agentes etiológicos são as enterobactérias do gênero *Salmonella* (BADRINATH *et al.*, 2004).

O princípio do diagnóstico microbiológico constitui-se de fases de isolamento em meios específicos. Em se detectando visualmente colônias suspeitas, procede-se aos testes bioquímicos e sorológicos. A pesquisa completa de *Salmonella* sp. pode levar de quatro a cinco dias para ser feita, sendo portanto laborioso e demorado. Uma alternativa para contornar este problema seria através do uso das ferramentas da Biologia Molecular que disponibilizam um diagnóstico preciso e rápido. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), são construídas pequenas seqüências (oligonucleotídeos) que se anelam em regiões específicas do material genético do organismo que se deseja estudar. Uma vez que o princípio de diagnóstico dessa ferramenta é o DNA (cromossomal ou plasmidial), o tempo gasto para a realização do procedimento varia de 12 a 18h. Isso porque requer apenas a etapa de pré-enriquecimento para a obtenção de uma maior quantidade de DNA (COQUARD *et al.*, 1999).

Uma variação da PCR é a PCR múltipla (mPCR). Essa técnica envolve mais de um par de oligonucleotídeos e permite, dentre outras aplicações, a realização de uma única reação para a detecção de vários tipos de microrganismos, de seus sorotipos ou de diferentes genes de um mesmo microrganismo (MALKAWI & GHARAIBEH, 2003).

A *Salmonella enterica enterica* sorotipo Typhi é específica do homem e quando encontrada indica falha na higiene e manipulação do alimento. Já os sorotipos Enteritidis e Typhimurium são encontrados em aves contaminadas mesmo antes do abate e estão presentes em surtos de toxinfecção alimentar em humanos (RABSCH *et al.*, 2001). A importância deste grupo de bactérias no beneficiamento de aves associado à ausência de métodos diagnósticos rápidos motivou a elaboração desse projeto de pesquisa, que buscou adaptar uma PCR múltipla a partir de protocolos usados por KUMAR *et al.* (2006) e ALVAREZ *et al.* (2004). Procede-se à detecção de *Salmonella* sp. e de *Salmonella enterica enterica* sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium por mPCR e realizou-se um levantamento da ocorrência desta bactéria em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Gerais

Adaptar a técnica de PCR múltipla (mPCR) para a detecção do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium em carcaças e miúdos resfriados de aves comercializadas no Distrito Federal

#### 3.2. Específicos

- Realização da mPCR com os oligonucleotídeos para a identificação do gênero *Salmonella* sp. e *Salmonella enterica enterica* sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium em carcaças e miúdos comercializados no Distrito Federal;
- Utilização do DNA total extraído do meio de pré-enriquecimento de carcaças e miúdos de aves comercializadas no Distrito Federal para a realização da mPCR;
- Verificar a ocorrência da presença desta bactéria em carcaças e miúdos de aves comercializadas no Distrito Federal;
- Realizar o isolamento por microbiologia tradicional das amostras paralelamente à mPCR;

#### 4. Revisão de Literatura

##### 4.1. Caracterização da bactéria

As bactérias do gênero *Salmonella* sp. são enterobactérias, bastonetes gram-negativos, com flagelos móveis, exceto os sorotipos Pullorum e Gallinarum, aeróbicos e anaeróbicos facultativos. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C no alimento e multiplicam-se numa faixa de pH entre 4,5 e 9,5. A atividade de água necessária para o desenvolvimento no meio é acima de 0,93 (D'AOUST, 2001). Seu perfil bioquímico caracteriza-se por produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, exceto a lactose e a sacarose. Além disso, são oxidase e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando o citrato como única fonte de carbono. Em geral produzem ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), descarboxilam a lisina e a ornitina e não hidrolisam a uréia (QUINN, 1994).

As salmonelas são capazes de resistirem por até nove meses sob solos úmidos, na água e em insumos para alimentação animal. Essas enterobactérias são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais utilizados nas indústrias tais como fenóis, clorados e iodados. São capazes de permanecerem viáveis por 13 meses a -21°C no ambiente. Entretanto, são destruídas a 60°C por cinco minutos (OLIVEIRA, 2000).

A classificação e a nomenclatura dessas bactérias sofreram modificações nos últimos anos e, atualmente, são baseadas em estudos moleculares. O gênero *Salmonella* possui um total de 2.579 sorotipos (Quadro 1), dos quais, 2.557 pertencem à *S. enterica* e 22 à *S. bongori*. Dentre os sorotipos presentes em *S. enterica*, 1.531 (59,87%) são da subespécie entérica, na qual estão incluídas os sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium. Dentre as salmoneloses humanas e animais, 99,5% são atribuídas à *Salmonella enterica enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007).

Quadro 1: Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de *Salmonella* spp.

<b><i>S. enterica</i></b>	<b>2.557</b>
<i>S. enterica enterica</i>	1.531
<i>S. enterica salamae</i>	505
<i>S. enterica arizonae</i>	99
<i>S. enterica diarizonae</i>	336
<i>S. enterica houtanae</i>	73
<i>S. enterica indica</i>	13
<b><i>S. bongori</i></b>	<b>22</b>
<b>Total (gênero <i>Salmonella</i>)</b>	<b>2.579</b>

Adaptado de GRIMONT & WEILL (2007); OLIVEIRA (2000).

A designação da *S. enterica enterica* (subespécie I) está relacionada com o local geográfico em que foi isolada pela primeira vez e seus sorotipos não são mais escritos em itálico e têm sua primeira letra maiúscula: Enteritidis, Newport, Dublin. O esquema de Kauffmann-White (Quadro 2) tem por base a composição antigênica das bactérias do gênero *Salmonella* com relação aos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (OLIVEIRA, 2000). Os

diferentes antígenos das salmonelas são identificados por meio de testes de imunoaglutinação com o emprego de anti-soros, preparados em coelhos, e cuja apresentação comercial se dá na forma de plasma liofilizado (TRABULSI *et al.*, 2005).

Quadro 2: Classificação para as principais espécies de *Salmonella* sp. pelo esquema de Kauffmann-White

Grupo	Sorotipo	Antígeno "O"	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	Paratyphi A	1, 2, 12	a	[1,5]
	Abortus equi	4, 12	-	e, n,x
B	Abortus ovis	4, 12	c	1, 6
	Typhimurium	1, 4, [5], 12	i	1, 2
	Paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
C1 e C4	Choleraesuis	6, 7	c	1, 5
	Typhi-suis	6, 7	c	1, 5
C2 e C3	Newport	6,8,20	e, h	1,2
	Typhi	9, 12	d	-
D1 e D2	Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
	Dublin	1, 9, 12,[Vi]	g, p	-
	Gallinarum	1, 9, 12	-	-
	Pullorum	9, 12	-	-

Adaptado de GRIMONT & WEILL (2007); OLIVEIRA (2000).

Os antígenos O são designados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* sp., sendo comum a vários sorotipos. Porém, segundo GORZYNSKI (1997) o polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), presente na camada peptidoglicana, é o principal antígeno de superfície dessas bactérias e sua especificidade antigênica deve-se a unidades repetidas de açúcares (tri, tetra ou pentassacarídeos). Exceção faz-se ao antígeno Vi, presente apenas no sorotipo Typhi.

Já os antígenos flagelares (H) podem ocorrer em duas fases (1 e 2) e são designados por letras minúsculas do alfabeto. Como seu número é maior do que a quantidade de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com indicadores numéricos ( $z_1, z_2, z_3$ ). A diferenciação entre as fases 1 e 2 ocorre quando uma *Salmonella* sp. de determinado antígeno flagelar se multiplica e dá origem a um clone que expressa um outro antígeno flagelar. Os antígenos de fase 1 (ou específica) caracterizam alguns sorotipos e aqueles de fase 2 são os mais comuns a vários sorotipos. Essa informação constitui um dos atributos utilizados para classificar as salmonelas (CAMPOS, 2005).

Essas bactérias podem ainda ser classificadas em dois grupos: aquelas incriminadas na febre entérica, tifóide ou paratífóide (grupos A, B ou C), e aquelas responsáveis pelos quadros clássicos de gastroenterite bacteriana aguda (sorotipos. Enteritidis e Typhimurium) (BHAGWAT *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2002).

#### 4.2. Fatores de virulência e patogenia

A transmissão de *Salmonella* sp. ocorre, usualmente, pela via oral. Há também suspeitas de infecção via membranas mucosas, conjuntivas e pelo trato respiratório superior. A ocorrência da doença entérica se dá com a colonização do intestino delgado distal e início do cólon. Desequilíbrios da flora intestinal e peristaltismo reduzido são alguns dos fatores que colaboram para a colonização pelas salmonelas (QUINN, 1994).

A capacidade de um microrganismo obter sucesso na invasão de seus hospedeiros está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência. Dentre estes, estão as fímbrias, as proteínas efetoras, os lipopolissacarídeos e os antígenos de superfície. As fímbrias estão associadas à adesão em diferentes células epiteliais e possivelmente, à matriz celular, fato que facilita a entrada e permanência das bactérias no organismo alvo (TRABULSI *et al.*, 2005). As proteínas de superfície estão associadas à colonização do ceco e na excreção prolongada de *Salmonella* sp. nas fezes (CAMPOS, 2005). Além disso, os sorotipos de *Salmonella* sp. são capazes de sobreviver e se multiplicar também nos macrófagos, fato que auxilia na sua manutenção e replicação no hospedeiro (ZHOU & GALAN, 2001).

A patogênese da *Salmonella* sp. está diretamente relacionada com a translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica e com a conseqüente alteração das funções celulares. As bactérias de *S. enterica* expressam pelo menos dois tipos de sistemas de secreção de proteínas do tipo III, e que estão localizadas em ilhas de patogenicidade designadas por SPI-1 e SPI-2 (*Specific Pathogenicity Island*). Tais sistemas possuem funções diferenciadas no ciclo patogênico: a expressão de SPI-1 é necessária para iniciar a infecção do epitélio intestinal e a de SPI-2 assume importância no estabelecimento da infecção sistêmica (SANO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007).

O sistema de secreção do tipo III é composto por um complexo de 20 proteínas que formam um canal na membrana da célula hospedeira. Uma vez formado, permite a exportação de outras proteínas, incluindo aquelas destinadas à captação da bactéria pela célula hospedeira (TRABULSI *et al.*, 2005). A interação de *Salmonella* sp. com a célula hospedeira induz uma gama de respostas celulares, dentre elas um rearranjo profuso do citoesqueleto de actina, o qual leva à interiorização da bactéria. Outra reação provocada na célula é a produção de citocinas da resposta inflamatória, associadas à inflamação intestinal, diarreia e, nos casos crônicos, formação de fibrose com prejuízo da absorção (GOMEZ & CLEARY, 1998; ZHOU *et al.*, 2001).

### 4.3. Salmonelose e saúde pública

#### 4.3.1. Epidemiologia

As salmonelas estão amplamente distribuídas e residem no trato intestinal tanto de animais de companhia, quanto daqueles usados para a produção de alimentos. O ser humano também alberga o microrganismo quando portador assintomático ou clínico de febre tifóide. Ovos, carnes de aves e alimentos delas derivados, sejam crus, mal-cozidos ou que sofreram contaminação cruzada, são os principais alimentos veiculadores de *Salmonella* sp. aos humanos. Em um estudo sobre os fatores epidemiológicos envolvidos em 23 surtos de salmoneloses ocorridos no estado de São Paulo, PERESI e colaboradores em 1998 observaram que a *Salmonella* sp. foi veiculada em 22 (95,7%) alimentos contendo ovos em sua composição.

A incidência de *Salmonella* sp., na Alemanha, foi de 63.044 casos no ano de 2003 (ARNOLD *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos, estima-se a ocorrência de dois a quatro milhões de casos por ano, dos quais uma média de 500 (0,025%) são fatais. Por se tratar de doença auto-limitante na maioria dos casos, as pessoas acometidas por DTAs como as salmoneloses não procuram atendimento médico aos primeiros sinais da doença (FRENZEN, 1999). Conseqüentemente, a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem que haja hospitalizações e, quando estas ocorrem, raramente se faz o isolamento dos agentes causais ou a pesquisa para confirmação do possível alimento incriminado. Desta forma, a prevalência de salmoneloses na população humana é subestimada (SANTOS *et al.*, 2002). A subnotificação é, provavelmente, uma realidade mundial. Segundo FORSYTHE (2002) e GERMANO (1993) somente 10% (dez por cento) do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil, evidenciando-se falhas nos sistemas de investigação e de notificação.

#### 4.3.2. A doença no homem

*Salmonella* sp. são patógenos intracelulares facultativos capazes de causarem doença local ou sistêmica com significativa morbidade e baixa mortalidade (BERGMAN *et al.*, 2005). *Salmonella enterica enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis foram os mais envolvidos em salmoneloses humanas pelo Centro para o Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC, Atlanta, GA). Atualmente, além já citados, foram isolados em doentes os sorotipos Heidelberg, Newport, Infantis, Agona, Montevideo e Saint Paul (CHIU *et al.*, 2005).

A dose infectante capaz de promover a sintomatologia clínica varia de acordo com o sorovar envolvido, a idade e o estado fisiológico do hospedeiro e com a composição físico-química do alimento contaminado (GOMEZ *et al.*, 1997). Em pacientes imunocomprometidos por exemplo, 15 unidades formadoras de colônias (UFC) são suficientes para iniciar a infecção. Em

pessoas saudáveis por sua vez, é necessário uma dose de  $10^5$  a  $10^8$  UFC (PREBAF, 2008). O período de incubação varia entre 6h e 48h, com média entre 12h à 36h.

A manifestação clínica da salmonelose confunde-se com outras toxinfecções alimentares. Alimentos ou água contaminados introduzem as salmonelas no trato gastrintestinal possibilitando a invasão e a colonização da submucosa adjacente. Caracteriza-se pela diarreia por vezes acompanhada de secreção purulenta, desidratação severa, dores abdominais e náuseas. Em regra, as salmoneloses são auto-limitantes em indivíduos hígidos. Estes, entretanto, podem desenvolver a forma crônica e assintomática da doença, podendo o quadro evoluir para uma fibrose intestinal persistente (GRASSL *et al.*, 2008). Indivíduos imunocomprometidos e fisiologicamente especiais (crianças, gestantes e idosos) podem morrer quando da infecção ou de complicações dela decorrentes (FORSYTHE, 2002).

As salmoneloses são objeto de grande preocupação, especialmente aquelas causadas por *Salmonella* Typhi, patógeno específico do homem e agente etiológico da febre tifóide. Essa doença caracteriza-se por uma infecção severa do sistema retículo endotelial, com inflamação dos órgãos linfóides, do intestino delgado, acompanhado de ulcerações e necrose das placas de Peyer. Além disso, pode haver peritonite severa, acidose, febre, hipotensão, coagulação intravascular disseminada, lesões renais, hepáticas e pulmonares e, ocasionalmente, ocorre óbito (OCHIAI *et al.*, 2008). Acredita-se que ocorram 16 milhões de casos com 500.000 mortes por ano ao redor do mundo (EVEREST *et al.*, 2001). O sorotipo Typhi pode crescer em meios de cultura e sobreviver em diversos organismos, apesar de ter no homem seu único hospedeiro natural (ZHANG *et al.*, 2008).

A doença causada pela *Salmonella* Enteritidis no homem pode se apresentar como uma gastroenterite até uma septicemia, causando severo dano (CASTILLA *et al.*, 2006). Existem relatos deste sorotipo envolvido em pericardite (PACE *et al.*, 2002), osteomielite (PIERROTTI *et al.*, 1996), abscesso cerebral (SARRIA *et al.*, 2000) e hepático (VIDAL *et al.*, 2003).

Um levantamento realizado pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo revelou que, entre as salmonelas isoladas de pacientes, a ocorrência do sorotipo Enteritidis aumentou nos últimos anos: passou de 0,37% entre os anos de 1970 a 1990 para 60,4% de 1991 a 1996 em amostras humanas. O isolamento feito em animais partiu de 0,85% entre 1970 a 1990 para 40,7% de 1991 a 1996. Esses números representam uma análise de mais de 48.000 amostras enviadas ao Instituto no período de 1970-1996. Vale lembrar que a notificação e o diagnóstico na população é subestimada.

*Salmonella* Typhimurium é um dos principais sorotipos isolados em casos esporádicos e surtos no Brasil. Está também associada a meningites, especialmente em crianças. Este sorotipo representa risco devido ao seu potencial invasivo e eminentemente patogênico. O fagotipo DT104 do sorotipo Typhimurium é considerado um patógeno emergente, altamente virulento e com resistência a antibióticos (DDTHA, 2005). Estes fatores estão relacionados a mutações nesse sorotipo assim como sua capacidade de sobreviver no interior de macrófagos (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997). O tratamento da toxinfecção provocada pelas bactérias do gênero *Salmonella* tem como objetivos a eliminação da bactéria pela administração de antibióticos. Além

disso, o restabelecimento dos déficits hídricos e nutricionais e o monitoramento do paciente para eventuais complicações em seu quadro clínico (ALEGADO & TAN, 2008).

A administração de antibióticos reduz a mortalidade, as complicações advindas da infecção e permite uma recuperação mais rápida do paciente (AKINYEMI & COKER, 2007). No caso da febre tifóide, a resposta à antibioticoterapia ocorre de forma satisfatória entre três a cinco dias, com a resolução da febre e de outros sintomas. Essa terapêutica deve garantir a erradicação da carga fecal de *Salmonella* sp. e deve ser segura para a aplicação em crianças (PARRY, 2006). Cloranfenicol foi um dos primeiros antibióticos utilizados no tratamento efetivo da febre tifóide. Ampicilina, amoxicilina, gentamicina, ciprofloxacina e trimetropin têm demonstrado ser efetivos no tratamento das salmoneloses (YU *et al.*, 2008).

O uso indiscriminado de antibióticos, entretanto, favoreceu o aparecimento de linhagens de *Salmonella* sp. resistentes, seja pela presença de plasmídios de resistência, seja pela incorporação destes no DNA cromossomal das bactérias. Essa situação reduz a eficácia do tratamento (AKINYEMI & COKER, 2007; BONINA *et al.*, 1990).

#### 4.3.3. Doença nas aves

Assim como o homem, as aves são susceptíveis a infecções por diversos sorotipos de *Salmonella* sp., sendo alguns deles específicos para esta espécie como os sorotipos Pullorum e Gallinarum (HUMPHREY *et al.*, 1988)..

Nas aves, a infecção causada por *S. Pullorum* é denominada pulorose em que a doença aguda acomete principalmente aves jovens, promovendo alta morbidade e mortalidade. Foi descrita pela primeira vez em 1889, por Rettger, como diarreia fatal dos pintinhos. Posteriormente foi designada por diarreia branca bacilar. A doença se disseminou pelos Estados Unidos e outros países no início do século XX. Os principais hospedeiros do sorotipo Pullorum são as galinhas, podendo acometer outras aves: perus, pardais, canários, faisões, codornas e papagaios (HOOP & ALBICKER-RIPPINGER, 1997). A principal via de transmissão é a vertical transovariana, em que as bactérias são disseminadas pelos ovos permanecendo viáveis durante meses (JÚNIOR, 2000).

O sorotipo Gallinarum, também específica, acomete preferencialmente aves adultas e sua manifestação clínica é conhecida como Tifo Aviário. Recebe essa denominação por sua semelhança com a febre tifóide humana. A morbidade é elevada e a mortalidade pode variar entre 10% e 80% (MSOFFE *et al.*, 2006; RABSCH *et al.*, 2000). O agente etiológico é disseminado pelas fezes, alimentos, água, cama, pessoas, aves silvestres, animais de estimação e moscas contaminados. A criação intensiva nas granjas é um dos fatores que contribuem para a rápida disseminação de doenças nos aviários (MOTARJEMI & KAFERSTEIN, 1997).

As ocorrências de toxinfecções alimentares em seres humanos, principalmente devido ao sorotipo Enteritidis, fizeram as salmoneloses aviárias serem reconhecidas como o maior problema da indústria avícola mundial, devido às perdas pela queda na produção e pelo descarte de animais doentes (HUMPHREY *et al.*, 1988; POPE & CHERRY, 2000).



#### 4.3.3.1. Sistema de criação das aves

O principal objetivo dos sistemas de criação intensiva é suprir a demanda por seus produtos em um menor tempo e com o menor custo possível. Para alcançar as metas estabelecidas pelos mercados consumidores, as empresas investem em melhoramento genético, manejo, nutrição e industrialização dos seus processos. O confinamento é uma estratégia que bem planejada aumenta a produtividade, reduz os custos e evita perda energética dos animais. Por outro lado, apresenta inconvenientes como distúrbios de comportamento, bem-estar animal, poluição ambiental e disseminação de patógenos (D'SILVA & STEVENSON, 1995). A falta de higiene na granja, a presença de pragas nos locais de criação, a contaminação de alimentos e água oferecidos, o uso de antimicrobianos de largo espectro como promotores de crescimento e a presença de animais portadores são fatores intimamente relacionados com a ocorrência de salmonelose aviária (DUNKLEY *et al.*, 2008).

Segundo GOMIDE *et al.* (2006), a ave contaminada é um dos fatores que podem contribuir para o consumo de um alimento não seguro para o homem. As etapas tecnológicas de obtenção de carcaças e cortes para o consumo também constituem risco potencial de contaminação, especialmente em algumas etapas tais como evisceração, pré-resfriamento e resfriamento, acondicionamento e transporte, as quais podem favorecer o crescimento microbiano. Ressalta-se a importância da higiene dos estabelecimentos e o atestado de saúde ocupacional dos funcionários como ponto crucial na produção de um produto de qualidade microbiológica

#### 4.4. Impacto econômico e legislação

A produção avícola é um importante segmento do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango. A otimização dos fatores produtivos e a preocupação com a qualidade final do produto agregam valor e conquistam cada vez mais mercados (ABEF, 2008). De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (2008), o Brasil configura como terceiro produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, respectivamente. Em se tratando de exportações, porém, assume o primeiro lugar, seguido dos Estados Unidos e da União Européia (Quadros 3 e 4).

Quadro 3 – Produção mundial de carnes de frango, nos principais países produtores, no período de 1999 – 2007\*\* (em mil toneladas)

<b>ANO</b>	<b>E.U.A.</b>	<b>CHINA</b>	<b>BRASIL</b>	<b>U.E.</b>	<b>MÉXICO</b>	<b>MUNDO</b>
<b>1999</b>	13.367	8.550	5.526	6.614	1.784	47.554
<b>2000</b>	13.703	9.269	5.977	7.606	1.936	50.097
<b>2001</b>	14.033	9.278	6.736	7.883	2.067	52.303
<b>2002</b>	14.467	9.558	7.517	7.788	2.157	54.155
<b>2003</b>	14.696	9.898	7.843	7.512	2.290	54.282
<b>2004</b>	15.286	9.998	8.494	7.627	2.389	55.952
<b>2005</b>	15.869	10.200	9.200	7.736	2.498	59.092
<b>2006*</b>	16.162	10.350	9.336	7.425	2.610	60.090
<b>2007**</b>	16.413	10.520	9.700	7.530	2.724	61.162

\* Preliminar

\*\*Previsão

Adaptado de ABEF (2008).

Quadro 4 – Exportação mundial de carne de frango, nos principais países exportadores, no período de 2000 – 2007\*\* (em mil toneladas)

<b>ANO</b>	<b>BRASIL</b>	<b>E.U.A.</b>	<b>U.E.</b>	<b>TAILÂNDIA</b>	<b>CHINA</b>	<b>MUNDO</b>
<b>2000</b>	907	2.231	774	333	464	4.856
<b>2001</b>	1.265	2.520	726	392	489	5.527
<b>2002</b>	1.625	2.180	871	427	438	5.702
<b>2003</b>	1.960	2.232	788	485	388	6.023
<b>2004</b>	2.470	2.170	813	200	241	6.055
<b>2005</b>	2.846	2.360	755	240	331	6.791
<b>2006*</b>	2.713	2.454	620	280	350	6.470
<b>2007**</b>	3.203	2.508	685	280	365	6.737

\* Preliminar

\*\*Previsão

Adaptado de ABEF (2008).

A crescente produção de aves vem ao encontro das necessidades do mercado, que, ao longo dos anos, aumentou a demanda por proteína animal. Deve-se este fato a uma intensa propaganda do produto, ao seu preço para o consumidor final e às oscilações do mercado mundial de carnes (ABEF, 2008). O quadro 5 apresenta o consumo mundial de carne de frango.

Quadro 5 – Consumo mundial da carne de frango, nos principais países consumidores, no período de 2000 – 2007\*\* (em mil toneladas)

<b>ANO</b>	<b>E.U.A.</b>	<b>CHINA</b>	<b>U.E.</b>	<b>BRASIL</b>	<b>MÉXICO</b>	<b>MUNDO</b>
<b>2000</b>	11.474	9.393	6.934	5.110	2.163	49.360
<b>2001</b>	11.558	9.237	7.359	5.341	2.311	50.854
<b>2002</b>	12.270	9.556	7.417	5.873	2.424	52.846
<b>2003</b>	12.540	9.963	7.312	5.742	2.627	52.903
<b>2004</b>	13.081	9.931	7.280	5.992	2.713	54.172
<b>2005</b>	13.428	10.088	7.503	6.612	2.871	57.339
<b>2006*</b>	13.817	10.370	7.405	6.622	3.010	58.888
<b>2007**</b>	13.901	10.585	7.490	7.120	3.148	59.744

\* Preliminar

\*\*Previsão

Adaptado de ABEF (2008).

Juntamente a uma maior produção e comercialização dos produtos avícolas, houve uma observação mais cautelosa da legislação, assim como implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) por parte das granjas produtoras e dos estabelecimentos beneficiadores de produtos avícolas (DE CESARE *et al.*, 2003).

Considerando a importância da produção avícola, no contexto nacional e internacional, e observando o processo de globalização, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento implementou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994). O objetivo do PNSA é normatizar as ações de acompanhamento sanitário das aves e estabelecer a cooperação entre as instituições públicas e privadas. Os programas sanitários do PNSA estão de acordo com normas sanitárias da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), englobando os programas para a Doença de Newcastle, Salmonelas e Micoplasmas.

Na legislação referente ao PNSA, destaca-se a Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003, que aprova as normas técnicas para o controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium* (BRASIL, 2003c). Em outra Instrução Normativa, a IN nº 70, de 10 de outubro de 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus (BRASIL, 2003a).

O controle nas indústrias e estabelecimentos beneficiadores é feito por meio da implementação das Boas Práticas de Fabricação e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC (FORSYTHE, 2002). Este passou a ser exigido, no Brasil, pela Portaria 1.428, de 02 de dezembro de 1993, do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993), aplicando-se, também, a todos os estabelecimentos que desenvolvam atividades relacionadas à alimentação. A legislação preconiza que produtores de gêneros alimentícios devem salvar amostras de alimentos por 72 horas e estas devem estar à disposição das autoridades sanitárias para as eventuais análises laboratoriais necessárias, como na ocorrência de surtos (DDTHA,

2005). A habilidade técnica para o monitoramento e detecção de *Salmonella* sp. e outros patógenos deve ser continuamente aperfeiçoada uma vez que a tolerância legal à presença *Salmonella* sp. é zero. Esse é um desafio aos países exportadores (JR *et al.*, 2004).

A importância das medidas de controle da qualidade microbiológica nos alimentos está em não oferecer riscos à saúde dos consumidores. Não obstante, a ocorrência de surtos envolvendo carnes de aves acarreta descredibilidade da marca beneficiadora, gerando insegurança, quedas no consumo e perda de mercados (GOLAN, 2003).

#### 4.5. Métodos de pesquisa de *Salmonella* sp. em alimentos de origem animal

##### 4.5.1. Microbiologia tradicional

A identificação de agentes microbianos é feita por métodos padronizados. Estes devem ser sensíveis, estáveis e aplicáveis a um conjunto de microrganismos. Os testes bioquímicos e a sorologia são alguns dos métodos atualmente empregados. Estes devem ser realizados em conjunto com a investigação epidemiológica na ocorrência e surtos de doenças. Para a identificação de determinado agente, faz-se necessário o conhecimento dos aspectos positivos e negativos de cada método diagnóstico disponível, de forma que a escolha do procedimento seja adequada a cada situação (BARON *et al.*, 1994).

A *Salmonella* sp. cresce em meio comum de nutrientes e muitas vezes são confundidas com coliformes. Em ágar sangue, as colônias medem de um a três milímetros de diâmetro após serem incubadas por 24 horas a 37°C. A forma das colônias nesse meio pode ser variável: lisas, circulares, convexas, achatadas, com bordos denteados ou não. As colônias assumem coloração leitosa. Cabe ressaltar que não produzem hemólise. Em ágar McConkey, as colônias são incolores por não consumirem lactose em 24 horas de incubação a 37°C (OLIVEIRA, 2000).

Meios seletivos foram desenvolvidos para melhor isolar e diferenciar alguns microrganismos. Para tanto, possuem fatores inibitórios ao crescimento de outras bactérias que não aquelas que se propõe selecionar (RALL *et al.*, 2005). Os meios seletivos mais usados para a identificação *Salmonella* sp. são o tetrionato, o caldo Tetrionato-Verde-Brilhante e o Caldo Selenito. Os meios sólidos empregados para a identificação da *Salmonella* sp. são o Ágar Triplo Açúcar e ferro (TSI – *Triple Sugar Iron*), com formação de coloração negra ao fundo do tubo pela formação de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S positivo), Ágar Deoxicolato Citralactose Sacarose (DCLS-Oxoid), Ágar-Verde-Brilhante e o meio SS (*Salmonella / Shigella*) (OLIVEIRA, 2000). Além desses, meios cromogênicos têm sido desenvolvidos, desde 1990, para detectar *Salmonella* sp., alguns dos quais o Rambach, SM-ID, CHROMagar, ABC *Medium*, *Chromogenic Salmonella esterase agar* e *Rainbow Salmonella agar*. Esses meios baseiam-se numa combinação de características bioquímicas e são altamente específicos (RALL *et al.*, 2005).

O ágar Hektoen é um exemplo de meio seletivo não-autoclavável. As concentrações de sais biliares, do azul de bromotimol e da fucsina ácida são suficientes para inibir o crescimento da maioria da microbiota intestinal. Permite, entretanto, o crescimento de bactérias do gênero

*Salmonella* e de *Shigella*. A adição de citrato férrico de amônio permite a formação de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e a formação de colônias verde-azuladas (KAUFMANN *et al.*, 2001).

Diferentemente de outras enterobactérias, as do gênero *Salmonella* não fermentam lactose do meio. Observou-se, entretanto, que esta característica pode variar entre colônias da mesma espécie, pois amostras de salmonelas podem adquirir plasmídeos que transportam genes que codificam enzimas que permitem a fermentação da lactose (plasmídeos lac+). Exemplo disso são amostras do sorotipo Typhimurium que fermentavam lactose isoladas na década de 1980: eram multirresistentes e provavelmente selecionadas por uso indiscriminado de antibióticos (CAMPOS, 2005).

A realização do teste rápido da urease permite a diferenciação entre as bactérias urease-positivas (*Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp.) das urease-negativas (*Salmonella* sp. e *Shigella* sp.). O método baseia-se na conversão da uréia em amônia, água e dióxido de carbono pelo intermédio da enzima urease. Os produtos resultantes da reação alcalinizam o meio e permitem a viragem colorimétrica de amarelo para vermelho quando da adição do indicador de fenol (SCHUURMAN *et al.*, 2007). Os testes bioquímicos permitem analisar o perfil metabólico dos microrganismos pesquisados e seus resultados são comparados com aqueles descritos na literatura, permitindo a identificação (OLIVEIRA, 2000).

As bactérias do gênero *Salmonella* podem ser também caracterizadas sorologicamente de acordo com seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi), tendo o esquema de Kauffmann-White como base (EVEREST *et al.*, 2001). Soros hiperimunes para *Salmonella* sp. são produzidos em coelhos. As colônias são dissolvidas em água destilada sobre uma lâmina de vidro e uma gota do soro é adicionada. Em se tratando de teste positivo para *Salmonella* sp., aglutinação é observada em poucos instantes (QUINN, 1994). O Quadro 6 apresenta o perfil bioquímico de diferentes sorotipos do gênero *Salmonella*.

*Salmonella* sp. também pode ser identificada por ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorben Assay*). Este é um teste imunológico de suporte sólido utilizado para a detecção de antígenos e que consiste basicamente na interação antígeno-anticorpo (MARTINEZ & TADDEI, 2005). A reação é revelada por uma reação enzimática que, dependendo do substrato enzimático empregado, pode vir acompanhado por alteração na cor, luz e formação de fluorescência. É um método rápido e que permite analisar um grande número de amostras. Exige que haja padronização prévia da concentração ótima, entre os reagentes imunológicos, adequação do binômio tempo-temperatura e dos controles negativos e positivos utilizados (CHAICUMPA *et al.*, 1995). Testes comerciais ELISA estão disponíveis para a identificação do gênero *Salmonella*, mas por serem importados, entretanto, apresentam elevado custo e requerem etapas adicionais de enriquecimento das amostras para atingir um número de células detectável pelo sistema. Não obstante, semelhanças antigênicas entre a microbiota do alimento e a *Salmonella* sp. podem gerar reações inespecíficas (SEO *et al.*, 1999).

Quadro 6 – Diferenças bioquímicas entre alguns sorotipos do gênero *Salmonella*.

Testes	Typhi	Pullorum	Gallinarum	Choleraesuis
Indol	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Citrato	-	V	V	(+)
H <sub>2</sub> S	+	V	V	V
Urease	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-
Motilidade	+	-	-	+
Gelatina	-	-	-	-
L-carboxilase	+	+	+	+
D-carboxilase	-	+	-	+
Malonato	-	-	-	-
Gás de glicose	-	+	-	+
Lactose	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+
Dulcitol	V	-	+	V
Adonitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Salicilina	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	-
Maltose	+	V	+	+
Arabinose	-	+	+	-
Rhamnose	-	+	+	+

V = variável

Adaptado de OLIVEIRA (2000).

A separação imunomagnética (IMS) é outro método imunológico empregado na identificação microbiológica. Utilizam-se esferas magnéticas de poliestireno cobertas com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos que possibilitam a imunocaptura e remoção de microrganismos em culturas líquidas pela aplicação de campo magnético. A técnica permite a concentração do microrganismo de interesse, inclusive daqueles debilitados por etapas de processamento dos alimentos (radiação, dessecação, conservação pelo frio). O IMS permite separar *Salmonella* sp. de outras enterobactérias, numa etapa que pode substituir o enriquecimento seletivo antes do plaqueamento com meio específico para *Salmonella* sp.. A técnica de separação imunomagnética pode ser associada à reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo a concentração do agente de interesse e sua separação de possíveis inibidores da reação (HAGREN *et al.*, 2008).

#### 4.5.2. Biologia Molecular como ferramenta de diagnóstico

Os principais métodos de identificação de *Salmonella* sp. são a caracterização bioquímica e as sorotipagens, suscetibilidade a antimicrobianos e a sorologia. Estes métodos são confiáveis, porém requerem longo tempo para a identificação do microrganismo além dos custos envolvidos (RALL *et al.*, 2005). A utilização de ferramentas da Biologia Molecular permite uma identificação mais precisa e rápida, com custos reduzidos. Dentre as ferramentas moleculares mais usadas estão a reação em cadeia da polimerase (PCR), a ribotipagem, clonagem e análise de restrição (BARON *et al.*, 1994).

##### 4.5.2.1. Princípios da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a identificação de microrganismo a partir do seu material genético. Esta ferramenta tem como princípio a produção em grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA, obtida a partir de uma fita de DNA de seqüência conhecida. A polimerase é a enzima que realiza a amplificação e multiplicação de uma fita molde. A complementaridade entre as bases nitrogenadas constituintes dos ácidos nucleicos e variações de temperatura permitem a reprodução *in vitro* do processo que ocorre *in vivo* (BARON *et al.*, 1994).

A fim de que a amplificação ocorra, inicialmente o DNA é aquecido e desnaturado a uma temperatura que varia de 94°C a 96°C. Os oligonucleotídeos iniciadores são posteriormente alinhados em suas seqüências-alvo a 30-60°C. A DNA polimerase, a partir dos desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) adicionados ao sistema, sintetizam o fragmento de DNA desejado (ALVAREZ *et al.*, 2004). A repetição destas etapas por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um segmento de DNA milhares de vezes (KUMAR *et al.*, 2008).

A PCR pode trabalhar tanto com DNA cromossomal quanto plasmidial. Aliadas a outras ferramentas moleculares, é possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie (DOUBLET *et al.*, 2008). O perfil pode ser obtido por meio de enzimas de restrição, as quais clivam o DNA em sítios específicos. A análise em gel de eletroforese do material genético clivado permite a visualização do padrão obtido. É esse padrão que será comparado com o banco de dados já existente e em constante atualização (SIEVERT *et al.*, 2008).

A PCR, aliada a outras ferramentas de Biologia Molecular, permitiu FEKETE & NAGY (2008) estudarem as características genéticas de cepas DT104 de *Salmonella* Typhimurium e a prevalência de SG11 – *Salmonella* Genomic Island 1. As cepas foram

isoladas de animais e alimentos na Hungria. Já EGOROVA e colaboradores em 2007 realizaram estudos sobre resistência antimicrobiana de salmonelas isoladas de adultos com gastroenterite em São Petersburgo, Rússia, entre os anos de 2002 e 2005. Além disso, conseguiram isolar os sorotipos Virchow e Newport com presença do gene *bla* – CTX-M-3 – de múltipla resistência a beta-lactâmicos.

Com as ferramentas da Biologia Molecular também é possível comparar os métodos moleculares usados na tipificação e diferenciação de *Salmonella* enquanto patógeno veiculado por alimentos (FOLEY *et al.*, 2007). Possibilita também o estudo quanto à dinâmica de infecção e os genes a ela relacionados (FUENTES *et al.*, 2008), fatores de patogenicidade e resistência a antimicrobianos (AMAR *et al.*, 2008), indução da resposta imunológica por frações moleculares (ABDELWAHEB & AHMED, 2008; AGORIO *et al.*, 2007; CHARLES *et al.*, 2008) desenvolvimento de vacinas recombinantes (AEBISCHER *et al.*, 2008; CHEMINAY & HENSEL, 2008) e de métodos de detecção dos microrganismos (ALVAREZ *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 1997; KAWASAKI *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de técnicas de identificação de microrganismos deve levar em consideração sua sensibilidade e especificidade. A detecção de um agente etiológico pode ser dificultada pela sua quantidade na amostra, pela interação com a microbiota competidora, componentes inibidores nos alimentos, semelhança antigênica do microrganismo com outras bactérias (BURTSCHER *et al.*, 1999). O ideal é que a técnica seja aplicável a uma grande variedade de alimentos, nas suas diversas apresentações (CHE *et al.*, 2000).



## 5. Materiais e Métodos

### 5.1. Obtenção dos controles positivos

Os controles positivos para a realização da pesquisa foram obtidos junto à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) localizada na cidade do Rio de Janeiro. As cepas oriundas da FIOCRUZ (*Salmonella enterica enterica* sorotipos Agona, Enteritidis, Typhi e Typhimurium) foram plaqueadas em Ágar Sangue no intuito de recuperar as células do estresse de resfriamento e transporte. Após o plaqueamento em Ágar McConkey e a constatação de colônias puras, as cepas foram submetidas à coloração de Gram e inoculadas em ágar TSI (*Triple Sugar Iron*). Posteriormente, as bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio L líquido (extrato de levedura 0,5%, peptona de caseína 1% e cloreto de sódio 1%) contidos em diferentes tubos esterilizados do tipo *falcon* de 50 mL. Os inóculos foram homogeneizados em homogenizador tipo *shaker*<sup>1</sup> a 200 rpm a 37°C *overnight*. Procedeu-se, então, a extração de DNA e a padronização da PCR e da PCR múltipla.

### 5.2. Extração de DNA total dos controles positivos

Observado o crescimento bacteriano por meio de turvação do meio L, procedeu-se à extração de DNA total por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (15:14:1) e precipitação do DNA por etanol 100% Cloreto de sódio na concentração final de 0,3Mm. Para este procedimento misturou-se 1,5 mL da solução de fenol/ clorofórmio com 1,5 mL do inoculo. O restante deste procedimento de obtenção do DNA total foi realizado de acordo com o protocolo preconizado por SAMBROOK & RUSSELL (2006). O resultado da extração do DNA total e sua quantificação foi observado em gel de agarose 0,8% com adição de 0,02% de brometo de etídio, com o uso de marcador de alto peso molecular *High mass ladde*<sup>2</sup> e visualizados equipamento transiluminador<sup>3</sup> sob raio ultravioleta e fotodocumentado<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA.

<sup>2</sup> Invitrogen®.

<sup>3</sup> Vilbert Lourmat®

<sup>4</sup> Sony® Graphic Printer UP-895CE

### 5.3. PCR dos controles positivos

A identificação das bactérias do gênero *Salmonella* e de *Salmonella enterica enterica* sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium, foi possível por meio da seleção de regiões específicas de genes que as identificam como tais. Para o gênero *Salmonella* (sorotipo Agona) selecionou-se um fragmento de 204 pares de bases (bp) do gene *ompC*, responsável pela produção de proteína C, responsável pela invasão de células epiteliais (oligonucleotídeos OMPCF e OMPCR) Para *Salmonella enterica enterica* sorotipo Enteritidis escolheu-se um fragmento de 304 pares de bases (bp) do gene *Sdf I* (333bp), região cromossomal relacionada com a capacidade de invasão e infecção de aves e ovos (oligonucleotídeos ENTf e ENTR). Para o sorotipo Typhimurium: selecionou-se um fragmento de 401 pares de bases (bp) do gene *Spy*, que codifica uma proteína periplasmática específica deste sorotipo, oligonucleotídeos TyphF e TyphR. Todos os oligonucleotídeos descritos anteriormente foram compilados de ALVAREZ e colaboradores em 2004. Já para o sorotipo Typhi, selecionou-se um fragmento de 738 pares de bases (bp) do gene *ViaB* (14.381bp), que codifica para síntese de proteínas da cápsula bacteriana (antígeno Vi), oligonucleotídeos ViaBF e ViaBR. Este par de nucleotídeos compilado de KUMAR *et al.* (2006). As seqüências dos oligonucleotídeos usados neste projeto estão no Quadro 7. Os oligonucleotídeos foram obtidos junto ao IDT® - *Integrated DNA Technologies*<sup>5</sup>.

Para cada um dos pares de oligonucleotídeos desenhados, foram realizadas reações de PCR com o DNA total extraídos das cepas de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium (controles positivos da FIOCRUZ) para a confirmação da especificidade. O protocolo de realização da PCR respeitou as particularidades de cada um dos pares de oligonucleotídeos desenhados, no que se refere a temperatura ótima de anelamento. Observou-se o funcionamento durante a reação frente a diferentes gradientes de concentrações de cloreto de magnésio (1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM e 3,5 mM). O cloreto de magnésio foi testado por ser importante co-fator enzimático da *Taq* polimerase. A temperatura média de anelamento dos oligonucleotídeos foi estimada em 57°C, mas para *Salmonella* Typhimurium a temperatura de anelamento foi de 55°C.

---

<sup>5</sup> Prodimol®

Quadro 7: Microrganismo, gene-alvo, seqüência e tamanho dos fragmentos a serem amplificados

	Bactéria	Gene-alvo	Oligonucleotídeos	Seqüência 5' – 3'	Tamanho (bp)	Número de Acesso (GenBank)
Gênero	<i>Salmonella</i> spp.	ompC	OMPCF	atc gct gac tta tgc aat cg	204	AY341077
			OMPCR	cgg gtt gcg tta tag gtc tg		
<i>Salmonella enterica enterica</i> Sorotipos	Enteritidis	Sdf I	ENTF	tgt gtt tta tct gat gca aga gg	304	AF370707
			ENTR	tga act acg ttc ggt cttctg g		
	Typhi	ViaB	ViaBF	cac gca cca tca ttt cac cg	738	D14156
			ViaBR	aac agg ctg tag cga ttt agg		
	Typhimurium	Spy	TyphF	ttg ttc act ttt tac ccc tga a	401	AE008757
			TyphR	ccc tga cag ccg tta gat att		

Adaptado de KUMAR *et al.* (2006) e ALVAREZ *et al.* (2004).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com 10 pmol de oligonucleotídeo *forward* e 10 pmol do oligonucleotídeo *reverse*, correspondentes ao gênero *Salmonella* e aos sorotipos propostos, 3,0 mM de cloreto de magnésio<sup>6</sup>, dinucleotídeos (dNTP)<sup>7</sup> a 2 mM final, tampão 10x<sup>8</sup> a concentração final de 1x, *Taq* polimerase<sup>9</sup> a 2 u, 5 ng de DNA total e água Milli-Q estéril completando para 25µL finais de reação.

Foram programados 29 ciclos com temperatura de desnaturação a 95°C por 2 min., temperatura de anelamento a 57°C e temperatura de finalização de 72°C por 2,5 min., ficando as amostras resfriadas a 4°C quando do término de todos os ciclos. As especificações do programa para a *Salmonella* Typhimurium foram basicamente as mesmas anteriores com ressalva da temperatura de anelamento de 55°C. A reação foi realizada em termociclador<sup>10</sup>. Todos as reações da PCR foram visualizados em transiluminador de raio ultravioleta<sup>11</sup> e fotodocumentados<sup>12</sup>.

Testes de especificidade foram realizados para se excluir a possibilidade de interação entre os pares de oligonucleotídeos. Ainda, foi verificado se ocorrem reações inespecíficas entre estes e os materiais genéticos dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium quando em reação com oligonucleotídeos que não lhes eram específicos.

Realizou-se o seqüenciamento automático no intuito de verificar a fidelidade de transcrição do material amplificado pela PCR. Utilizou-se, para tanto, o seqüenciador automático

<sup>6</sup> Cembiot-RS.

<sup>7</sup> Amershand®.

<sup>8</sup> Cembiot-RS.

<sup>9</sup> Cembiot-RS.

<sup>10</sup> PTC-100, M.J Research Inc., Watertown, Mass, USA.

<sup>11</sup> Vilbert Lourmat®

<sup>12</sup> Sony® Graphic Printer UP-895CE

MegaBACE® 1000<sup>13</sup>. Para o seqüenciamento foram preparados dois tubos de polipropileno 0,5 mL para *Salmonella* sp. e para *Salmonella enterica enterica* sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium, cada qual com as respectivas regiões gênicas amplificadas por PCR e purificadas com kit de purificação de produto de PCR (QIAquick 50, Quiagen®). Um dos tubos continha apenas o oligonucleotídeo *Foward* e o outro apenas o *Reverse*.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências armazenadas no banco de dados do GenBank por meio do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (disponível no *site*: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### 5.4. PCR múltipla dos controles positivos

Após a construção dos oligonucleotídeos e estabelecidos os protocolos individuais supracitados, foram realizadas diversas reações de PCR múltiplas com o DNA obtido dos controles positivos (molde). Essas reações consistiram na adição de todos os pares de oligonucleotídeos para a *Salmonella* sp. e os sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium, em uma única reação, adicionados da *mix* para PCR e usando o termociclador previamente programado. A reação possui, portanto, o par de oligonucleotídeos que amplificam o gene *invA* (OMPCF, OMPCR – 204bp), presente em todo o gênero *Salmonella*, quanto o par específico para os sorotipos Enteritidis (ENTF, ENTR – 304bp), Typhi (ViaBF, ViaBR – 738bp) e Typhimurium (TyphF, TyphR – 401bp). Em resultados positivos, a expectativa foi a de visualizar em gel de agarose duas fragmentos: uma correspondente a 204 bp (OMPCF e OMPCR gênero) e outra fragmento quando da identificação dos sorotipos Enteritidis (304 bp), Typhi (738 bp) ou Typhimurium (401 bp).

#### 5.5. Contaminação do caldo de carne de aves

No intuito de comprovar a viabilidade da técnica de detectar *Salmonella* sp. em amostras de caldos de carnes de aves, procedeu-se à contaminação dos mesmos com cepas de cada um dos sorotipos com o intuito de se obter diferentes gradientes de concentração de bactérias ( $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC). O objetivo foi verificar se a reação ocorreria dentro do esperado, se haveria algum fator inibitório presente no caldo decorrente do processamento das amostras. Ainda, visou verificar a sensibilidade da PCR em relação à concentração de bactérias no meio. A contaminação foi feita de acordo com o descrito por KUMAR *et al.* (2006). A partir do caldo de carne obtido com a utilização de 25 g de carne de frango resfriada, previamente testada e negativa para *Salmonella* sp., adicionadas de 225 mL de água peptonada tamponada estéril e homogeneizada em *stomacker*<sup>14</sup> por 1min. Foram feitas alíquotas de 50 mL em tubos Falcon® e estas submetidas a centrifugação<sup>15</sup> por 5min a 3.000 rpm. Alíquotas de 10 mL do sobrenadante

---

<sup>13</sup> Amersham Biosciences®.

<sup>14</sup> Mayo®

<sup>15</sup> Eppendorf® Centrifuge 5804R

foram estocados sob refrigeração em tubos Falcon® de 50 mL. As bactérias foram inoculadas em alíquotas de 100 mL de solução salina 0,85% estéril. As soluções com diferentes concentrações de bactéria foram filtradas em filtro de Milipore® com poros de filtração de 0,45 µm de diâmetro. Os filtros foram inoculados separadamente em 50 mL de caldo de carne a 37°C por 24h. Após o período, realizou-se a extração do DNA total a partir de 1 mL do caldo contaminado para a realização da PCR e da mPCR.

#### 5.6. Origem das carcaças e dos miúdos resfriados de aves

As carcaças e miúdos resfriados de aves foram coletados de estabelecimentos comerciais da região do Distrito Federal. A coleta foi realizada da mesma forma que o consumidor a faz quando vai às compras. Totalizaram 200 amostras, das quais 127 foram de carcaças (frangos inteiros e eviscerados) e 73 amostras de miúdos, cada qual com coração, moela e fígado até completarem 100g.

As amostras foram transportadas, em caixa isotérmica, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da UnB. Neste, eram imediatamente pesadas 25g de cada amostra em fluxo laminar esterilizado e acondicionadas em sacos de *stomacker*. Posteriormente, foram adicionadas de 225 mL de água peptonada tamponada, homogenizadas e incubadas a 37°C por 24h. O restante da amostra foi mantido sob congelamento.

#### 5.7. Extração de DNA total das carcaças resfriadas e dos miúdos de aves

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada a partir da obtenção de um total de 25 g de várias partes de cada amostra, cada qual adicionada de 225 mL de água peptonada tamponada, denominada de fase de enriquecimento, de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 18 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003b). O material foi incubado em estufa bacteriológica<sup>16</sup> por 24h a 37°C, período após o qual foi coletado 1 mL para a extração de DNA total, que também seguiu o protocolo de extração de DNA total pelo método de fenol/ clorofórmio descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2006).

#### 5.8. PCR das carcaças e miúdos resfriados de aves

O DNA total obtido de cada amostra foi submetido à PCR com os oligonucleotídeos OMPCF e OMPCR (gênero). Nos casos em que se observou reação positiva para o gênero *Salmonella* (fragmento de 204bp em gel de agarose 2%), as amostras foram submetidas à PCR múltipla para a identificação dos sorotipos Enteritidis, Typhi ou Typhimurium, se presentes.

#### 5.9. PCR múltipla das carcaças e miúdos resfriados de aves

---

<sup>16</sup> Quimis®

A mPCR foi realizada nas amostras positivas para o gênero de acordo com o protocolo de mPCR feito para os controles positivos. Em uma mesma mPCR foram adicionados os oligonucleotídeos OMPCF e OMPCR (gênero *Salmonella*), ENTF e ENTR (sorotipo Enteritidis) e ViaBF e ViaBR (sorotipo Typhi) à temperatura de anelamento de 57°C. Em separado, realizou-se a mPCR com OMPCF e OMPCR em conjunto com TyphiF e TyphiR (sorotipo Typhimurium) devido à temperatura de anelamento de 55°C.

#### 5.10. Análise microbiológica carcaças resfriadas e dos miúdos de aves

Paralelamente aos testes com a PCR e com a mPCR, foram realizados os protocolos de pesquisa microbiológica preconizado pela Instrução Normativa nº 62 de 18 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003b). De cada uma das amostras foram coletadas 25g, de diferentes partes do produto e adicionadas de 225 mL de água peptonada tamponada estéril (diluição de 1:10). Foram mantidas em estufas bacteriológicas<sup>17</sup> a 37°C por 24h. Após o período de pré-enriquecimento, 1 mL deste caldo foi inoculado em 9 mL caldo Rappaport®, mantido a 42°C por 24h em estufa bacteriológica. Posteriormente, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, plaqueou-se 10 µL do caldo Rappaport em ágar Hektoen® (37°C por 24h). A presença de colônias verde-azuladas translúcidas neste meio é característica de *Salmonella* sp.. Selecionou-se uma colônia característica e plaqueou-se em Ágar McConkey®. Neste, *Salmonella* sp. apresenta-se como colônia rosada e translúcida. Com o auxílio de uma alça fina devidamente esterilizada, selecionou-se uma colônia e a inoculou em ágar TSI (37°C por 24h). No TSI, a *Salmonella* sp. produz H<sub>2</sub>S (coloração negra), produção de gás (fermentação da glicose), o bisel permanece com a coloração avermelhada do meio (não fermentação de lactose ou sacarose). Observadas estas características, procede-se aos testes bioquímicos complementares (ornitina, uréia, VM/VP, citrato, fenilalanina, glicose, lactose, sacarose, manitol, malonato, lisina, sorbitol). Em resultados positivos no perfil bioquímico para *Salmonella* sp., realizou-se a sorologia<sup>18</sup> para a confirmação do diagnóstico.

#### 5.11. Avaliação estatística da ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças e miúdos de aves

Os resultados de ocorrência da *Salmonella* spp. nas matrizes carcaças e miúdos de aves, detectados por mPCR e por diagnóstico bacteriológico tradicional, foram analisados pelo software @RISK 5.0<sup>19</sup>. Este programa permite a avaliação da probabilidade de contaminação das carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal por *Salmonella* sp.

---

<sup>17</sup> Quimis®

<sup>18</sup> Probac® - Antígenos somático (O) e flagelar (H)

<sup>19</sup> Palisade @RISK 5.0 para Microsoft Excel

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1. Controles positivos

Para a recuperação das cepas de *Salmonella* sp., foram feitos plaqueamentos sucessivos em meios nutritivos e seletivos. Procedeu-se, também, à coloração de Gram e à inoculação em ágar TSI (Figura 1) para a confirmação da presença de *Salmonella* sp. e da pureza do cultivo. As cepas oriundas da FIOCRUZ foram viabilizadas com sucesso.

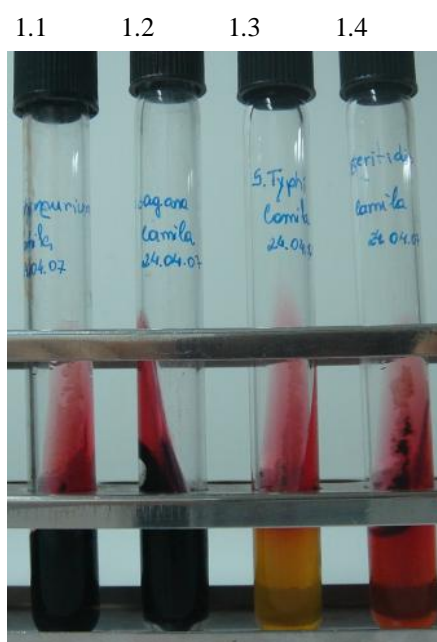


Figura 1. Cepas de *Salmonella* sp. em Ágar Ferro e Três Açúcares (TSI – *Triple Sugar Iron*). 1.1) *Salmonella* sorotipo Typhimurium; 1.2) *Salmonella* sorotipo Agona; 1.3) *Salmonella* sorotipo Enteritidis; 1.4) *Salmonella* sorotipo Typhi.

### 6.2. Extração de DNA total dos controles positivos

As bactérias isoladas (sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium) foram inoculadas separadamente em meio L a 37°C por 24h para se multiplicarem e aumentar as chances de se obter expressivas quantidades de DNA total. O material genético foi extraído por fenol-clorofórmio e álcool isoamílico (15:14:1) e ressuspenso em 30 µL de água MilliQ estéril. A quantificação foi feita em gel de agarose a 0,8%. As quantidades observadas de DNA variaram entre 5-10 ng/µL (Figura 2).

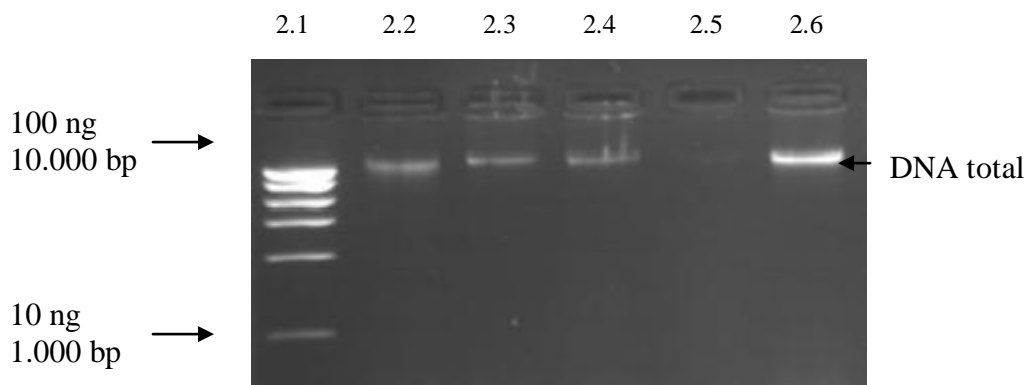


Figura 2: Extração de DNA total dos controles positivos de *Salmonella* sp. 2.1) marcador *high mass* (Invitrogen®); 2.2) DNA total do sorotipo Enteritidis (5 ng/μL); 2.3) DNA total do sorotipo Typhi (5 ng/μL); 2.4) DNA total do sorotipo Typhimurium (5 ng/μL); 2.5 e 2.6) DNA total do gênero *Salmonella* (1 ng/μL e 10 ng/μL, respectivamente). Visualização em gel de agarose 0,8% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

Em relação ao método de extração de DNA total, KUMAR *et al.* (2006) realizaram-na utilizando o método de extração por fervura. ALVAREZ *et al.* (2004), HALATSI *et al.* (2006) também optaram por este método. Neste trabalho optou-se por fazer a extração pelo método de fenol/ clorofórmio com o objetivo de minimizar possíveis reações inespecíficas ou até mesmo a não reação conforme discutido por SAMBROOK & RUSSELL (2006), apesar daqueles autores não terem tido problemas em relação a método de extração por fervura.

### 6.3. PCR dos controles positivos

A reação em cadeia da polimerase foi realizada para o gênero e para cada um dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium, com o objetivo de padronizá-las individualmente. A melhor concentração de cloreto de magnésio em que a reação ocorreu de forma mais ajustada foi de 3 mM. Mantiveram-se as concentrações iniciais propostas para os demais reagentes: 10 pmol de oligonucleotídeo *forward* e 10 pmol do oligonucleotídeo *reverse*; dinucleotídeos (dNTP) a 2 mM final; tampão 10x a concentração final de 1 x; *Taq* polimerase a 2 u; 5 ng de DNA e água MilliQ estéril para completar 25 μL de reação.

Cada um dos oligonucleotídeos utilizados possuíam diferentes temperaturas ideais de anelamento ( $T_m$ ), sendo a  $T_m$  do gênero *Salmonella* sp. de 55°C, do sorotipo Enteritidis de 59°C, do sorotipo Typhi de 57°C e o do sorotipo Typhimurium de 55°C. A fim de se realizar posteriormente a PCR múltipla, buscou-se uma temperatura média de anelamento para todos os pares de oligonucleotídeos. A  $T_m$  foi de 57°C para o gênero *Salmonella* e para os sorotipos Enteritidis e Typhi, e 55°C para o sorotipo Typhimurium. Estas temperaturas mostraram-se adequadas à reação. Os resultados obtidos demonstram que a temperatura de anelamento de 57°C mostrou-se adequada para a identificação de *Salmonella* sp., e dos sorotipos Enteritidis e



Typhi. Com essa temperatura, entretanto, não ocorreu a reação para o sorotipo Typhimurium. A identificação deste sorotipo foi possível reduzindo-se a temperatura de anelamento para 55°C, o que não interferiu na identificação do gênero, possível tanto a 55°C quanto a 57°C, e sem a presença de reações inespecíficas (Figura 3). Estes resultados de ajustes de temperatura de anelamento divergiram dos resultados encontrados por ALVAREZ *et al* (2004) em que estes autores utilizaram a temperatura de 57°C para o gênero *Salmonella* e para os sorotipos Enteritidis e Typhimurium. Os resultados obtidos por este trabalho se assemelham aos obtidos por KUMAR *et al* (2006) em que os mesmos utilizaram a temperatura de anelamento de 55°C para a identificação do sorotipo Typhi. Embora as temperaturas usadas neste trabalho sejam diferentes daquelas utilizadas pelos citados autores, as reações de PCR ocorreram com sucesso.

Em cada uma das reações realizadas, observou-se a amplificação de fragmento de DNA com tamanho esperado, sendo um fragmento de 204 bp para a identificação do gênero, 304 bp para o sorotipo Enteritidis, 738 bp para o sorotipo Typhi e 401 bp para o sorotipo Typhimurium (Figura 3).

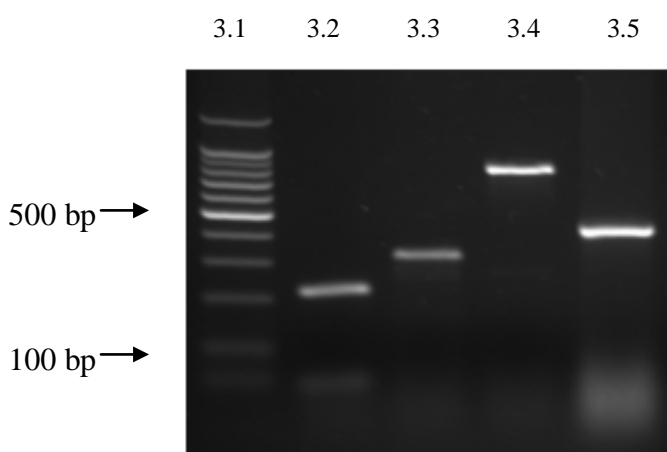


Figura 3: PCR dos controles positivos para o gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium. 3.1) marcador 100 bp DNA *ladder* (Promega®) 3.2) Fragmento de 204bp de *Salmonella* sp.; 3.3) Fragmento de 304bp do sorotipo Enteritidis; 3.4) Fragmento de 738bp do sorotipo Typhi e 3.5) Fragmento de 401bp do sorotipo Typhimurium. Visualização em gel de agarose a 2% com o a concentração de 0,02% de brometo de etídio.

Após a realização da PCR, procedeu-se a purificação dos produtos gerados e foram enviados para o seqüenciamento automático pelo MegaBACE®. Os resultados obtidos demonstraram a fidelidade de transcrição e a especificidade dos oligonucleotídeos empregados. Quando analisadas pelo BLAST, as seqüências obtidas foram fidedignas tanto ao gênero (variação em torno de 98% de fidelidade de transcrição) quanto para cada um dos sorotipos utilizados pelo projeto (Figuras 4 e 5).

```

Salmonella enterica enterica serotipo Enteritidis - Sequência específica I
Tamanho=333bp

Score = 435 bits (235), Expect = 5e-119
Identidade = 242/245 (98%), Falhas = 3/245 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 14  GAGAGCGGG-TTGATGTGGTTGG-TCCTCACTGATTTTTTAGGGCGCTTTGTGCAGCGAG 71
          |||
Sbjct  82  GAGAGCGGGTTTGATGTGGTTGGTTCGTCACTGATTTTTTAGGGCGCTTTGTGCAGCGAG 141

Query 72  CATGTTCTGGAAAAGCCTCTTTATATAAGCTCATTCTGACSTTTAAGCCGGTCAATGAGTTT 131
          |||
Sbjct 142  CATGTTCTGGAAAAGCCTCTTTATATAAGCTCATTCTGACCTCTAAGCCGGTCAATGAGTTT 201

Query 131  TTCTTTCTCAGATTCAGGGAGTATATCAAAAAAGGTTTAGTAAATCAGCCTGTTGTCTGCT 191
          |||
Sbjct 202  TTCTTTCTCAGATTCAGGGAGTATATCAAAAAAGGTTTAGTAAATCAGCCTGTTGTCTGCT 261

Query 190  CACCATTGCCCAGCCACCACCTTCGAAGTTGTCATCGTAAGTACCAGAAGAACGAACGTA 251
          |||
Sbjct 262  CACCATTGCCCAGCCACCACCTTCGAAGTTGTCATCGTAAGTACCAGAAGAACGAACGTA 321

Query 252  GTTCA 256
          |||
Sbjct 322  GTTCA 326

```

Figura 4: Resultado do BLAST do sorotipo Enteritidis após o seqüenciamento automático. Este apresentou uma identidade de 98% (fita verde) quando comparado com a seqüência presente no banco de dados do GenBank® (fita em azul). Os números à direita e à esquerda indicam a posição da base nitrogenada.



Os testes de especificidade dos oligonucleotídeos foram feitos realizando-se várias PCRs individuais, adicionando DNA de um dos sorotipos de *Salmonella* como molde e pares de oligonucleotídeos dos outros sorotipos. Os resultados destas reações demonstraram que os oligonucleotídeos utilizados eram específicos para as regiões alvo de seus respectivos sorotipos e ainda permitiram a realização da PCR múltipla (Figuras 6, 7, 8 e 9).

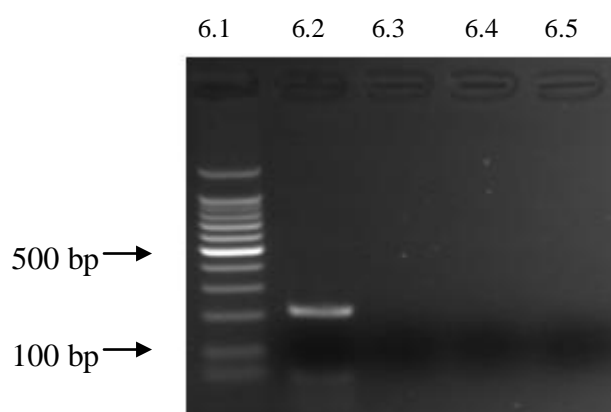


Figura 6: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total de *Salmonella* sp. como molde: 6.1) marcador 100 bp DNA *ladder*; 6.2) reação positiva com oligonucleotídeos para o gênero *Salmonella* (204 bp); 6.3) reação negativa com oligonucleotídeos para o sorotipo Enteritidis; 6.4) reação negativa com oligonucleotídeos para o sorotipo Typhi; 6.5) reação negativa com oligonucleotídeos para o sorotipo Typhimurium. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

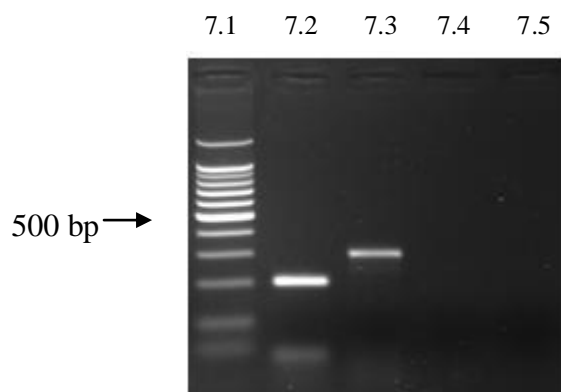


Figura 7: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Enteritidis como molde: 7.1) marcador 100 bp DNA ladder; 7.2) reação positiva com oligonucleotídeos para o gênero *Salmonella* (204 bp); 7.3) reação positiva com oligonucleotídeos para *S. Enteritidis* (304 bp); 7.4) reação negativa com oligonucleotídeos para *S. Typhi*; 7.5) reação negativa com oligonucleotídeos para *S. Typhimurium*. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

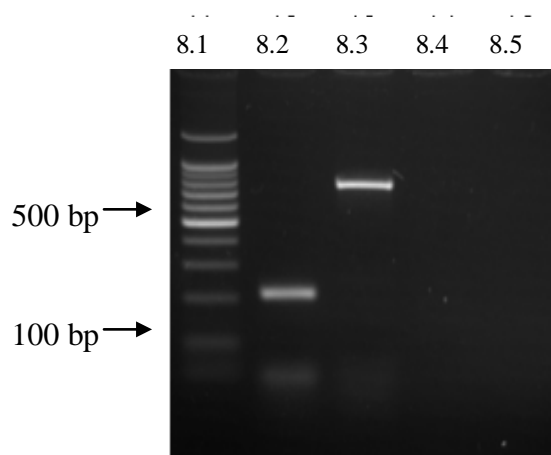


Figura 8: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Typhi como molde: 8.1) marcador 100 bp DNA ladder; 8.2) reação positiva com oligonucleotídeos para o gênero *Salmonella* (204 bp); 8.3) reação positiva com oligonucleotídeos para *S. Typhi* (738 bp); 8.4) reação negativa com oligonucleotídeos para *S. Enteritidis*; 8.5) reação negativa com oligonucleotídeos para *S. Typhimurium*. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

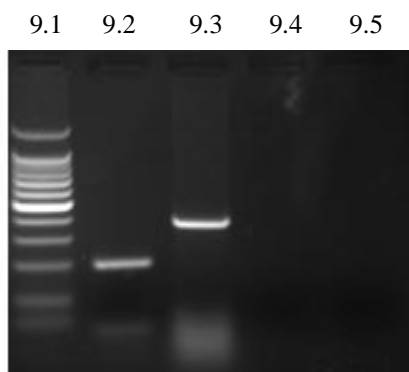


Figura 9: Verificação da especificidade dos oligonucleotídeos do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium usando DNA total do sorotipo Typhimurium como molde: 9.1) marcador 100 bp DNA ladder; 9.2) reação positiva com oligonucleotídeos para o gênero *Salmonella* (204 bp); 9.3) reação positiva com oligonucleotídeos para o sorotipo Typhimurium (401 bp); 9.4) reação negativa com oligonucleotídeos para o sorotipo Enteritidis; 9.5) reação negativa com oligonucleotídeos para o sorotipo Typhi. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

Os resultados destas reações foram condizentes com as reações realizadas por ALVAREZ *et al.* (2004), que trabalharam com os pares de oligonucleotídeos para o gênero *Salmonella*, e para os sorotipos Enteritidis e Typhimurium. Também foram similares com as reações realizadas por KUMAR *et al.* (2006) que trabalharam com o sorotipo Typhi.

#### 6.4. PCR múltipla dos controles positivos

A padronização da PCR múltipla envolveu primeiramente a otimização da PCR para o gênero e para cada sorotipo em separado. Para tanto, observou-se as concentrações mínimas ótimas de cada um dos reagentes para a reação em cadeia da polimerase.

A PCR múltipla foi preparada com todos os pares de oligonucleotídeos na concentração de 10 pmL (OMPCF/OMPCR para o gênero *Salmonella* sp., ENTF/ENTR para o sorotipo Enteritidis, ViaBF/ViaBR para o sorotipo Typhi e TyphF/TyphR para o sorotipo Typhimurium). A mPCR foi feita com as mesmas concentrações e reagentes da PCR. O volume final, entretanto, foi de 30  $\mu$ L (Figura 10).

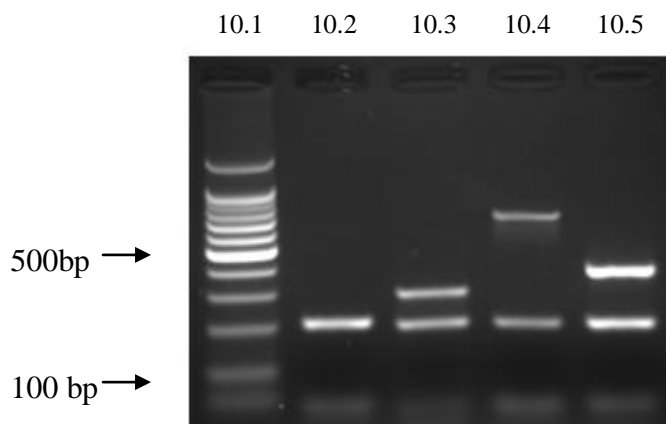


Figura 10: PCR múltipla para identificação de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium; 10.1) marcador DNA *ladder* 100bp; 10.2) fragmento de 204 bp do gênero *Salmonella*; 10.3) fragmento de 204 bp do gênero *Salmonella* e fragmento de 304 bp do sorotipo Enteritidis; 10.4) fragmento de 204 bp do gênero *Salmonella* e fragmento de 738 bp do sorotipo Typhi; 10.5) fragmento de 204 bp do gênero *Salmonella* e fragmento de 401 bp do sorotipo Typhimurium. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

#### 6.5. Contaminação do caldo de carne de aves

Foram realizadas com êxito tanto a contaminação do caldo de carnes de aves com diferentes concentrações de bactérias ( $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC) quanto todas as PCRs para cada uma das concentrações dos diferentes sorotipos (Figuras 11, 12, 13 e 14), em que se pôde verificar a não existência de substâncias inibidoras da PCR ou mPCR presentes no caldo de carne de aves. Verificou-se ainda que a técnica de mPCR funcionou em todas as concentrações propostas, com sensibilidade de detecção em quantidades de até  $10^{-1}$  UFC.

Tal qual preconizado por KUMAR e colaboradores em 2006 com cepas do sorotipo Typhi inoculadas em caldo de carne, oriundas de Madhya Pradesh na Índia, este trabalho conseguiu reproduzir a detecção de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium em todos os diferentes gradientes de concentração analisados.

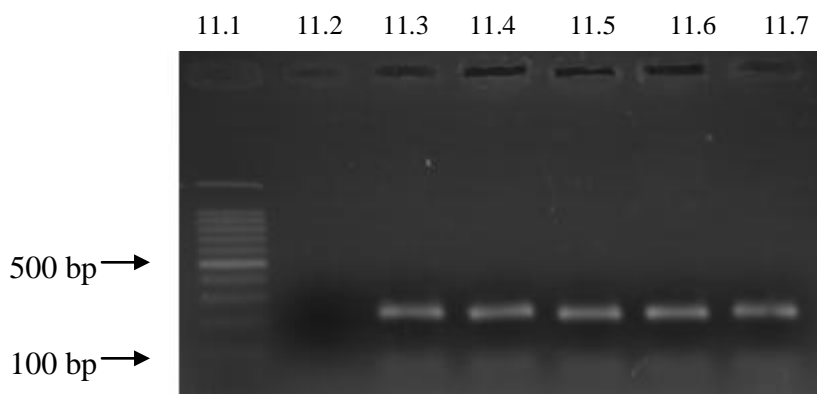


Figura 11: Resultado da mPCR para detecção do gênero *Salmonella* em caldo de carne de aves previamente contaminados com *Salmonella enterica enterica* sorotipo Agona nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC. 11.1) marcador 100 bp DNA ladder; 11.2) controle negativo; 11.3) contaminação com  $10^{-1}$  UFC; 11.4) contaminação com  $10^0$  UFC; 11.5) contaminação com  $10^1$  UFC; 11.6) contaminação com  $10^2$  UFC; 11.7) contaminação com  $10^3$  UFC. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

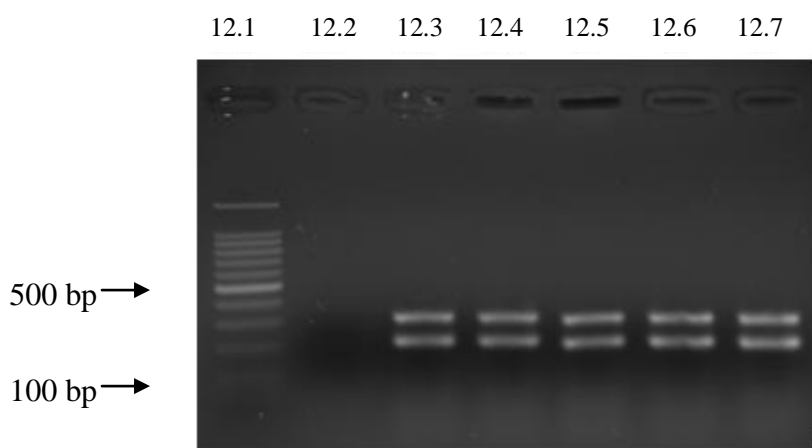


Figura 12: Resultado da mPCR para detecção do gênero *Salmonella* e do sorotipo Enteritidis em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Enteritidis nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC. 12.1) marcador 100 bp DNA ladder; 12.2) controle negativo; 12.3) contaminação com  $10^{-1}$  UFC; 12.4) contaminação com 100 UFC; 12.5) contaminação com 101 UFC; 12.6) contaminação com 102 UFC; 12.7) contaminação com 103 UFC. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.



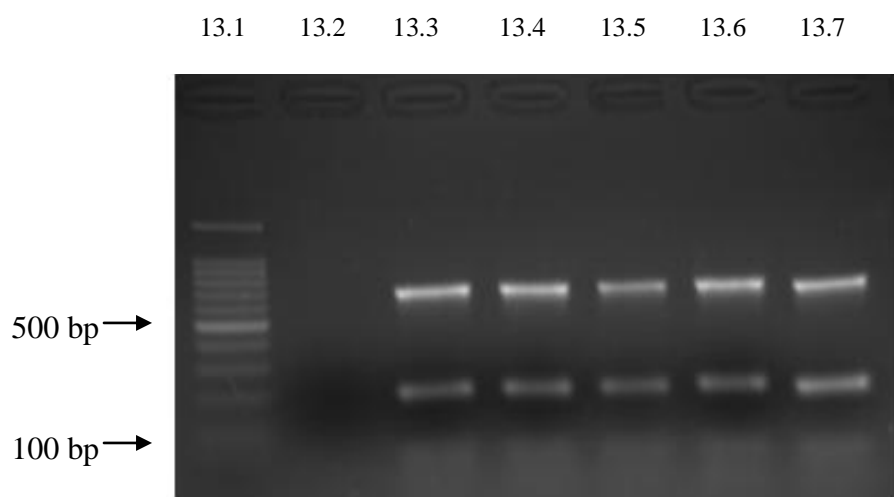


Figura 13: Resultado da mPCR para detecção do gênero *Salmonella* e do sorotipo Typhi em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Typhi nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC. 13.1) marcador 100 bp DNA ladder; 13.2) controle negativo; 13.3) contaminação com  $10^{-1}$  UFC; 13.4) contaminação com  $10^0$  UFC; 13.5) contaminação com  $10^1$  UFC; 13.6) contaminação com  $10^2$  UFC; 13.7) contaminação com  $10^3$  UFC. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

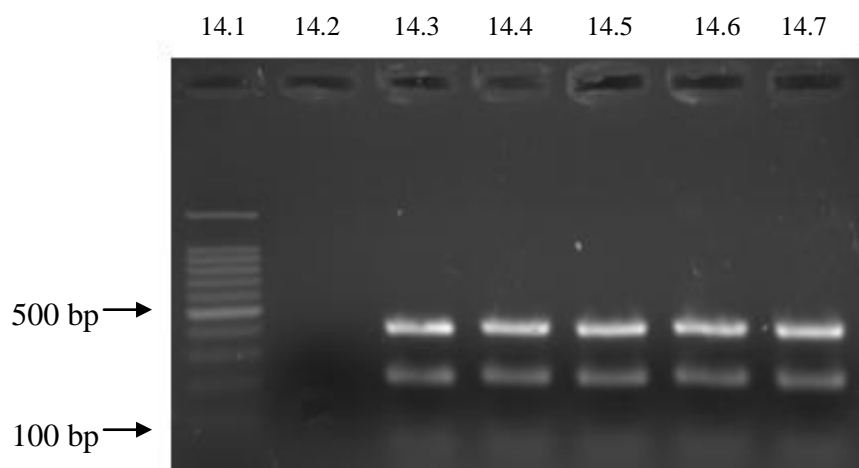


Figura 14: Resultado da mPCR para detecção do gênero *Salmonella* e do sorotipo Typhimurium em caldo de carne de aves previamente contaminados com o sorotipo Typhimurium nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC. 14.1) marcador 100 bp DNA ladder; 14.2) controle negativo; 14.3) contaminação com  $10^{-1}$  UFC; 14.4) contaminação com  $10^0$  UFC; 14.5) contaminação com  $10^1$  UFC; 14.6) contaminação com  $10^2$  UFC; 14.7) contaminação com  $10^3$  UFC. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

#### 6.6. Extração de DNA total das carcaças e miúdos resfriados de aves comercializados no Distrito Federal

O DNA total de cada uma das amostras foi obtido com sucesso, a partir do caldo de pré-enriquecimento, em concentrações aproximadas que variaram entre 5 e 10 ng/ $\mu$ L. Os DNAs totais obtidos foram usados como molde nas reações de PCR e de mPCR de pesquisa de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium.

#### 6.7. Ocorrência de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium detectados por PCR, mPCR e por diagnóstico microbiológico tradicional em carcaças resfriadas e miúdos de aves comercializadas no Distrito Federal

Das 73 amostras de miúdos, foram isoladas 02 (2,74%) cepas de *Salmonella* sp. por PCR. Após a realização da mPCR para a detecção dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium, uma das amostras foi identificada como sendo Enteritidis (Figura 15). A outra amostra, porém, não teve o sorotipo identificado pela mPCR, mas apenas o gênero (Figura 16). Isto se deve ao fato do projeto ter trabalhado com três sorotipos, sendo que o *Salmonella enterica enterica* apresenta 2.557 sorotipos. Das 127 carcaças resfriadas de frango, nenhuma apresentou resultado positivo para *Salmonella* sp. na PCR, mesmo realizando a coleta de fragmentos da região do pescoço, embaixo das asas e próximo a região cloacal como preconizado por NÓGRÁDY *et al.* (2008).

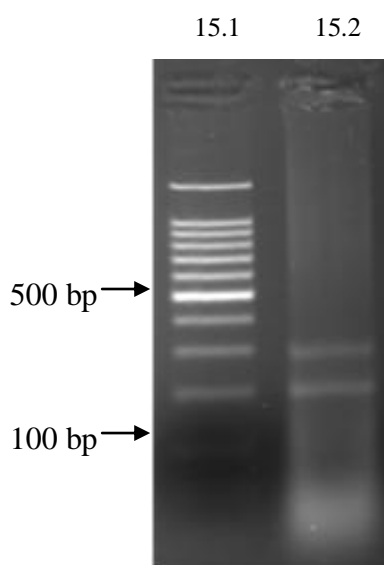


Figura 15: PCR múltipla para identificação de *Salmonella* sp. e do sorotipo Enteritidis de miúdos resfriados de aves. 15.1) marcador 100 bp DNA ladder; 15.2) PCR múltipla com fragmento de 204 bp do gênero *Salmonella* e fragmento de 304 bp do sorotipo Enteritidis. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

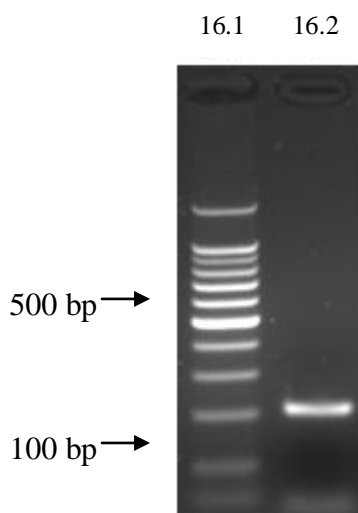


Figura 16: PCR múltipla par a identificação de *Salmonella* sp. de miúdos resfriados de aves. 17.1) marcador 100 bp DNA *ladder*; 17.2) PCR múltipla com fragmento do gênero *Salmonella* sp. de 204 bp. Visualização em gel de agarose a 2% com concentração de 0,02% de brometo de etídio.

Em relação ao diagnóstico microbiológico tradicional, das 73 amostras de miúdos resfriados de aves, foram isoladas 02 (2,74%) cepas de *Salmonella* sp. Os testes bioquímicos permitiram identificar *Salmonella* sp. em ambas as amostras, mas não os sorotipos. Já das 127 amostras de carcaças resfriadas de frango, nenhuma cepa de *Salmonella* sp. foi isolada.

Os resultados de ocorrência com detecção por mPCR e pelo diagnóstico microbiológico tradicional, tanto nas amostras de carcaças como nas amostras de miúdos, foram iguais. Foram confirmadas duas amostras positivas para *Salmonella* sp. (2,74%), dado semelhante ao encontrado no relatório do Programa de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos, PREBAF, de 2008, em que se encontrou 2,85% de cepas de *Salmonella* sp. na região do Distrito Federal. Os dados do projeto são similares ainda aqueles obtidos em relação à ocorrência nacional de presença de salmonelas em carne de frango, que foi de 4%. Quanto à identificação dos sorotipos, a mPCR permitiu a identificação do sorotipo Enteritidis (1,37%) nos miúdos de aves da região do Distrito Federal, sendo inferior ao encontrado naquele programa (48,8%), entretanto o dado do PREBAF 2008, porém, é nacional e não faz referência à identificação dos sorotipos por região. Ainda em relação à identificação nacional do sorotipo Enteritidis, vale ressaltar que a metodologia empregada para esta diferenciação foi a sorológica realizada pela FIOCRUZ, que é um laboratório de referência para este tipo de análise no Brasil. A vantagem da técnica desenvolvida no presente trabalho, é que o mesmo conseguiu identificar por meio da mPCR não apenas o gênero *Salmonella* sp. como também o sorotipo Enteritidis, fato que diminui o tempo de pesquisa do microrganismo e permite simultaneamente saber qual dos três sorotipos está envolvido na contaminação do alimento.

Pelo método de identificação microbiológica tradicional, NUNES *et al.* (1995) realizaram um levantamento da ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças e cortes de frangos

comercializados em Goiânia-GO no ano de 1995. Para tanto utilizaram-se da pesquisa microbiológica por meio de enxaguadura e maceração da pele das amostras. Esses pesquisadores encontraram uma frequência média de 13,2% de *Salmonella* sp. e os sorotipos mais prevalentes foram o Brandenburg e o Typhimurium, sendo que a sorotipificação foi realizada na FIOCRUZ. Talvez os resultados encontrados por estes pesquisadores naquele ano sejam devido a não existência da implantação e fiscalização da IN nº 70 (BRASIL, 2003a) pelo MAPA nas indústrias beneficiadoras.

Em relação aos resultados da mPCR, esse trabalho identificou *Salmonella* sp. em 2,74% das amostras de miúdos, sendo que em uma das amostras foi identificado o sorotipo Enteritidis. A técnica de mPCR foi utilizada com sucesso por KUMAR *et al.* (2006) para a detecção de diferentes genes de virulência do sorotipo Typhi. ALVAREZ *et al.* (2004) utilizaram-se da mesma técnica para a detecção e tipificação epidemiológica de *Salmonella* sp. em amostras clínicas de pacientes.

A identificação de vários sorotipos de *Salmonella* sp. por mPCR proposta nesta dissertação assemelha-se ao trabalho realizado por O'REAGAN *et al.* (2008), os quais utilizaram mPCR em tempo real para a detecção de múltiplos sorotipos de *Salmonella* sp. em carnes de aves. Além dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium propostos neste trabalho, aquele grupo de pesquisadores trabalhou com a identificação dos sorotipos Gallinarum, Kentucky e Dublin. O presente trabalho propôs-se a identificar o sorotipo Typhi, que é um sorotipo de grande importância para a saúde pública devido à possibilidade de portadores assintomáticos. De acordo com EVEREST *et al.* (2001), acredita-se que ocorram 16 milhões de casos com 500.000 mortes por ano ao redor do mundo.

Em relação aos dados obtidos, no que se refere à presença da *Salmonella* sp. em miúdos e não em carcaças de aves, os mesmos corroboram com os resultados de NUNES *et al.* (1995), os quais verificaram uma maior presença dessa enterobactéria em cortes de frango do que nas carcaças. Logo, pode-se inferir que uma maior manipulação de miúdos e de cortes de aves pode estar relacionada com a maior probabilidade da presença de *Salmonella* sp.

Utilizando a técnica simples de PCR, NÓGRÁDY *et al.* (2008), na Hungria, fez o diagnóstico de sorotipo Infantis em amostras obtidas junto aos abatedouros e às clínicas com casos notificados de salmoneloses. Os pesquisadores identificaram o sorotipo Infantis em de 43% das amostras ambientais e em 35% entre carcaças e cortes de frangos. No mesmo estudo, cinco amostras positivas para *Salmonella* sp. foram identificadas pela PCR enquanto os testes microbiológicos dessas mesmas amostras apresentaram resultado negativo para esta enterobactéria. Este fato evidencia que *Salmonella* sp. pode estar presente em quantidades abaixo do limite de detecção do método microbiológico tradicional de cultivo. A técnica de PCR por trabalhar com o DNA apresenta a vantagem em relação ao diagnóstico microbiológico por não depender de quantidades expressivas de bactéria no alimento para a sua identificação.

A utilização de ferramentas da Biologia Molecular, tal qual a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR múltipla, possibilita à indústria um maior controle de qualidade microbiológica. Nas plantas de beneficiamento, a pesquisa de *Salmonella* sp. por PCR múltipla

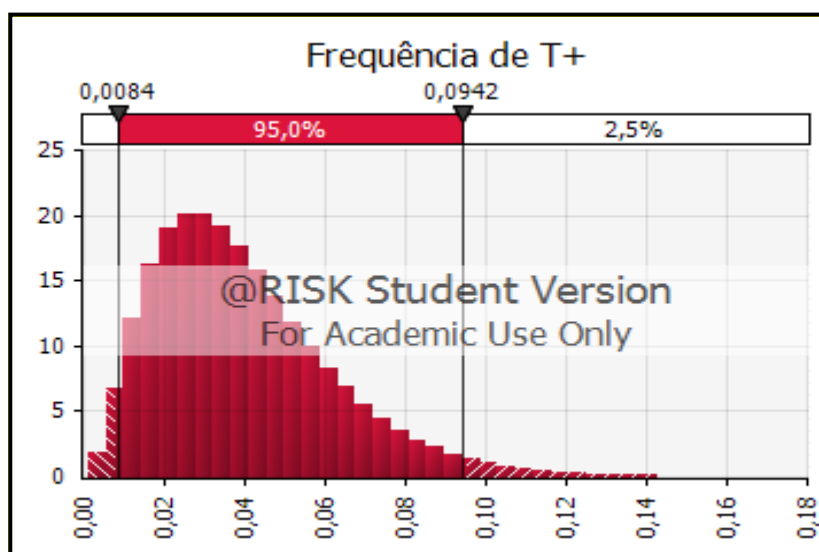
identifica de forma rápida e precisa este microrganismo. Isto permite que sejam tomadas medidas corretivas em tempo hábil, de forma a não disseminar a contaminação.

O emprego bem sucedido da técnica de mPCR proposta neste trabalho para a identificação dos três sorotipos (Enteritidis, Typhi e Typhimurium) é um estímulo ao desenvolvimento e utilização de outros oligonucleotídeos para a identificação de um número maior de sorotipos. A técnica pode ainda ser ampliada para a pesquisa de *Salmonella* sp. em outras bases cárneas.

#### 6.8. Análise Estatística da ocorrência de *Salmonella* sp. em miúdos de aves comercializados no Distrito Federal

Os dados de ocorrência de *Salmonella* sp. detectada por mPCR e pelo diagnóstico microbiológico tradicional em miúdos de aves comercializados no Distrito Federal foram tratados no software @Risk® 5.0 para Excel®. As interpretações permitem, assumindo um intervalo de confiança de 95 %, inferir que probabilidades de contaminação dos miúdos de aves, do Distrito Federal, por *Salmonella* sp., foi de 0,84%, no mínimo, e de 9,42%, no máximo, estando a probabilidade média de contaminação em 4,00% (Figura 17). Verificou-se que o gráfico apresenta um desvio à direita relacionado com uma menor confiabilidade na probabilidade de ocorrência de *Salmonella* sp., uma vez que o número de amostras positivas foi pequeno em relação ao número total de amostras analisadas.

Figura 17: Análise da probabilidade de ocorrência de *Salmonella* sp. em miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.



De acordo com a OPAS/OMS (2008), a análise de risco permite identificar um problema em potencial, avaliar a probabilidade de sua ocorrência, estimar o seu impacto e sugerir medidas para solucioná-los. A análise estatística realizada por esse estudo demonstra que há uma probabilidade média de 4,00% dos miúdos de aves, da região do Distrito Federal, estarem contaminados por *Salmonella* sp.

A presença da *Salmonella* sp. sorotipos Enteritidis e Typhimurium nos alimentos de origem animal, é indicativa ou de falhas no manejo das aves ou de manipulação inadequada dos alimentos, uma vez que esses dois sorotipos podem afetar tanto o homem quanto as aves. Já a presença do sorotipo Typhi, específico do homem, indica uma contaminação dos produtos por portadores assintomáticos desta enterobactéria.

BADRINATH *et al.* (2004) ao investigarem um surto de salmonelose pelo sorotipo Enteritidis em um restaurante chinês, em Suffolk na Inglaterra, usaram os dados levantados pela vigilância epidemiológica para estabelecer a provável fonte de contaminação. A investigação levou a conclusão de que a exposição dos ovos a temperatura ambiente por um longo período de tempo, possibilitou a proliferação da *Salmonella* sp. e a ocorrência do surto. Ainda relacionado com o correto manuseio dos alimentos e sua importância para a saúde pública, BEATTY *et al.* (2008) relatam um surto de salmonelose em uma conferência ocorrida em Dallas no Texas, em 2002. A análise de risco apontou a manipulação de alimentos por portadores assintomáticos de *Salmonella* sp. sorotipo Enteritidis como fonte de infecção.

A importância das salmoneloses na saúde pública está diretamente relacionada com a qualidade microbiológica do produto que chega ao consumidor. A preocupação com a qualidade deve estar presente em todas as etapas de produção do alimento, envolvendo o manejo adequado da produção e do abate. Ainda, a implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são fundamentais no processo de beneficiamento dos alimentos, uma vez que permitem prever e prevenir a ocorrência de falhas e, quando destas, adotar medidas corretivas que sejam eficientes na resolução da não conformidade apresentada.

A técnica de identificação de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium por meio de PCR múltipla é possível de ser empregada na avaliação de alimentos naturalmente contaminados como demonstram os resultados. Estes também demonstram que o emprego de PCR e mPCR solucionam algumas limitações do isolamento microbiológico tradicional, a saber o tempo de identificação do microrganismo, que na microbiologia pode levar de uma semana a 15 dias em contraste com as 18 h necessárias quando do emprego de PCR ou mPCR. A não precisão de um número de células viáveis significativos para a detecção da bactéria é outra vantagem, uma vez que a PCR pode gerar milhões de cópias a partir de uma fita de DNA e assim conseguir detectar a presença da bactéria.

## 7. Conclusões

A PCR e a mPCR foram adaptadas com sucesso para os controles positivos obtidos junto à FIOCRUZ.

Os protocolos e oligonucleotídeos utilizados foram efetivos para a amplificação do fragmento de 204 bp do gene *ompC* para o gênero *Salmonella*, do fragmento de 304 bp do gene *Sdf I* do sorotipo Enteritidis, do fragmento de 738 bp do gene *ViaB* do sorotipo Typhi e fragmento de 401 bp do gene *Spy* relativo ao sorotipo Typhimurium.

Os resultados apresentados pela detecção molecular e pela microbiologia tradicional foram iguais, tanto com os resultados positivos quanto nos negativos, para *Salmonella* sp. A mPCR identificou, entretanto, o sorotipo Enteritidis em uma amostra de miúdo resfriado, sorotipo não identificado pelos testes bioquímicos. Na outra amostra de miúdo, a mPCR identificou apenas o gênero *Salmonella*. Cabe ressaltar que o projeto trabalhou com três dos 2.557 sorotipos de *Salmonella enterica enterica* já identificados.

Dada a importância que as toxinfecções alimentares assumem no contexto da saúde pública, este trabalho apresentou uma alternativa de diagnóstico na identificação de patógenos. A sua confiabilidade e o tempo de execução tornam-na possível de ser empregada em conjunto com a pesquisa microbiológica tradicional ou em casos de surtos. Vale ressaltar que a *Salmonella* sp. é um dos patógenos envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos, podendo a técnica aqui descrita ser mais estudada e aprofundada, inclusive desenvolver ainda protocolos para identificação de outros sorotipos. A base da metodologia pode ser ampliada para estudos de sorotipos emergentes na saúde pública e de outros microrganismos também de interesse na área de microbiologia de alimentos.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABDELWAHEB, C., AHMED, L. Acid pre-adaptation enhances virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dam mutant. **Pathol Biol (Paris)**. 2008.
- ABEF. **Produção mundial de carne de frango**. Disponível em [www.abef.com.br](http://www.abef.com.br). Acessado em 05 out. 2008
- AEBISCHER, T. *et al.*, Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. **Gut**. 57(8):1065-1072. 2008.
- AGORIO, C. *et al.*, Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. **The Journal of Gene Medicine** 9(5):416-423. 2007.
- AKINYEMI, K. O.,COKER, A. O. Trends of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhi isolated from hospitalized patients from 1997 to 2004 in Lagos, Nigeria. **Indian Journal of Medical Microbiology**. 25(4):436-437. 2007.
- ALEGADO, R. A.,TAN, M. W. Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella typhimurium* in the *C. elegans* intestine. **Cellular Microbiology**. 10(6):1259-1273. 2008.
- ALVAREZ, J. *et al.*, Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(4):1734-1738. 2004.
- AMAR, C. F. *et al.*, Real-time PCRs and fingerprinting assays for the detection and characterization of *Salmonella* Genomic Island-1 encoding multidrug resistance: application to 445 European isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*. **Microbial Drug Resistance**. 14(2):79-92. 2008.
- ARNOLD, T. *et al.*, Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Disease Veterinary Public Health**. 51(10):459-463. 2004.
- BADRINATH, P. *et al.*, An outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 34a infection associated with a Chinese restaurant in Suffolk, United Kingdom. **BMC Public Health**. 440. 2004. **Epidemiology and Infection**. 1-11. 2008
- BARON *et al.* **Diagnostic Microbiology**, 9 ed. Mosby, Missouri. 1994.



BEATTY, M.E. *et al.*, Large *Salmonella* Enteritidis outbreak with prolonged transmission attributed to an infected food handler, Texas, 2002.

BERGMAN, M. A. *et al.*, CD4+-T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC. **Infection and Immunity**. 73(11):7226-7235. 2005.

BHAGWAT, A. A. *et al.*, Detection of *Salmonella* species in foodstuffs. **Methods in Molecular Biology**. 42933-43. 2008.

BONINA, L. *et al.*, Beta-lactam antibiotics (aztreonam, ampicillin, cefazolin and ceftazidime) in the control and eradication of *Salmonella typhimurium* in naturally resistant and susceptible mice. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 25(5):813-823. 1990.

BRASIL. Portaria 1.423 de 02.12.1993.

**Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de prestação de serviços na área de alimentos e o Regulamento Técnico para o estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para serviços e produtos na área de alimentos.** Ministério da Saúde. 1993

BRASIL. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994. **Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícolas e cria o Comitê Consultivo do PNSA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1994

BRASIL. Instrução Normativa nº 70 de 10 de outubro de 2003. **Institui o Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus.** Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003a

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 18 de setembro de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003b

BRASIL. Instrução Normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003. **Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003c

- BURTSCHER, C. *et al.*, Detection of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. 65(5):2235-2237. 1999.
- CAMPOS, L. C. **Microbiologia**, 4 ed. Atheneu, São Paulo. 2005.
- CASTILLA, K. S. *et al.*, Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in Salmonella Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. (37):135-139. 2006.
- CHAICUMPA, W. *et al.* Monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for the detection of Salmonella in foods. **Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology**13(2):159-166. 1995.
- CHARLES, J. F. *et al.*, The innate immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium by macrophages is dependent on TREM2-DAP12. **Infection and Immunity**. 76(6):2439-2447. 2008.
- CHE, Y. H. *et al.*, Rapid detection of Salmonella typhimurium in chicken carcass wash water using an immunoelectrochemical method. **Journal of Food Protection**®. 63(8):1043-1048. 2000.
- CHEMINAY, C., HENSEL, M. Rational design of Salmonella recombinant vaccines. **Int J Med Microbiol**. 298(1-2):87-98. 2008.
- CHEN, S. *et al.*, A rapid, sensitive and automated method for detection of Salmonella species in foods using AG-9600 AmpliSensor Analyzer. **Journal of Applied Microbiology**.83(3):314-321. 1997.
- CHIU, T. H. *et al.*, Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of Salmonella spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**. 97(3):259-265. 2005.
- COQUARD, D. *et al.*, Routine detection of Salmonella species in water: comparative evaluation of the ISO and PROBILIA polymerase chain reaction methods. **Journal of AOAC International**. 82(4):871-876. 1999.
- D'AOUST, J. Y. **Salmonella species**. Hardcover, New Jersey. 2001.
- D'SILVA, J., STEVENSON, P. **Modern breeding technologies and the welfare of farm animals**. Disponível em [http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm\\_docs/2008/m/modern\\_breeding\\_technologies\\_and\\_farm\\_animal\\_welfare\\_1995.pdf](http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/m/modern_breeding_technologies_and_farm_animal_welfare_1995.pdf). Acessado em 02 out. 2008

- DAS, S. *et al.*, Serotypic and antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* species isolated from cases of gastroenteritis at Infectious Diseases Hospital (IDH), Delhi from 1997-2000. **The Journal of Communicable Disease**. 34(4):237-244. 2002.
- DDTHA. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004 CVE/CCD-SES. **Revista Saúde Pública**. 39(3):515-518. 2005.
- DE CESARE, A. *et al.*, Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**®. 66(9):1587-1594. 2003.
- DENIS, M. *et al.*, Diversity of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broiler chickens in France. **Poultry Science**. 87(8):1662-1671. 2008.
- DOUBLET, B. *et al.*, Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. **Journal of Microbiological Methods**75(2):359-361. 2008.
- DUNKLEY, K. D. *et al.*, Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**. 2008.
- EGOROVA, S. *et al.*, Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant nontyphoidal *Salmonella* isolates in adults in Saint Petersburg, Russia (2002-2005). **Microbial Drug Resistance**. 13(2):102-107. 2007.
- EVEREST, P. *et al.*, The molecular mechanisms of severe typhoid fever. **Trends Microbiol.** 9(7):316-320. 2001.
- FACH, P. *et al.*, Evaluation of a polymerase chain reaction-based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples: Probable *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**®. 62(12):1387-1393. 1999.
- FEKETE, P. Z., NAGY, B. *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) and genetic characteristics of animal and food isolates of *Salmonella typhimurium* DT104 in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**. 56(1):5-11. 2008.
- FLÔRES, M. L. *et al.*, Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**. 33(3):553-557. 2003.
- FLORESTA, F. A. Condições para a indução do estado viável não-cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli*. **Universidade Federal de Viçosa**. XV55. 2006.
- FOLEY, S. L. *et al.*, Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. **Foodborne Pathogens Disease**. 4(3):253-276. 2007.

- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Arthmed, Porto Alegre. 2002.
- FRENZEN, P. D. *Salmonella* cost estimate update using FoodNet data **Food Safety**. 22(2):10-15. 1999.
- FUENTES, J. A. *et al.*, The *Salmonella* Typhi hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. **Research in Microbiology**. 159(4):279-287. 2008.
- FUNG, D. Y. Predictions for rapid methods and automation in food microbiology. **Journal of AOAC International**. 85(4):1000-1002. 2002.
- GERMANO, P. M. L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. . **Higiene Alimentar**. 7(27):6-11. 1993.
- GOLAN, E. H. Calculating the cost of foodborne illness - A new tool to value food safety risks. **Diet and Health**. 1(2):6-7. 2003.
- GOMEZ, H. F.,CLEARY, G. G. **Salmonella**, 4 ed. Saunders Co., Philadelphia. 1998.
- GOMEZ, T. M. *et al.*, Foodborne salmonellosis. **World Health Statistics Quarterly**. 50(1-2):81-89. 1997.
- GOMIDE, L. A. M. *et al.*, **Tecnologia de abate e tipificação de carcaças**. UFV, Viçosa - MG. 2006.
- GORZYNSKI, E. A. *Enterobacteriaceae e Vibrionaceae In Microbiologia oral e imunologia*. R. J. Nisengard and M. G. Newman, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2<sup>a</sup> ed., 154-165. 1997.
- GRASSL, G. A. *et al.*, Chronic enteric salmonella infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. **Gastroenterology**. 134(3):768-780. 2008.
- GRIMONT, H. F.,WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the Salmonella serovars**, 9 ed. Institut Pasteur. 2007.
- HAGREN, V. *et al.*, An 8-hour system for *Salmonella* detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR. **International Journal of Food Microbiology**. 125(2):158-161. 2008.
- HALATSI, K. *et al.*, PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. **FEMS Microbiology** 259:201-207. 2006
- HOOP, R. K.,ALBICKER-RIPPINGER, P. *Salmonella gallinarum-pullorum* infection of poultry: experiences in Switzerland. **Schweiz Arch Tierheilkd**. 139(11):485-489. 1997.

- HUMPHREY, T. J. *et al.*, Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemiological overview. **Epidemiology and Infection**. 100(2):175-184. 1988.
- JR, K. H. M. *et al.*, Food safety issues for meat / poultry products and international trade. **Diet, Safety and Health**. USDA, AIB 789-41-2. 2004.
- JÚNIOR, A. B. Salmoneloses aviárias *In Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, ed., 2000.
- KAUFMANN, S. H. *et al.*, Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from Salmonella. **Microbes and Infection**. 3(14-15):1177-1181. 2001.
- KAWASAKI, K. *et al.*, Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Journal of Endotoxin Research**. 11(1):57-61. 2005.
- KUMAR, R. *et al.*, Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of Salmonella in seafood. **Letters in Applied Microbiology**. 46(2):221-226. 2008.
- KUMAR, S. *et al.*, Detection of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of invA, viaB, fliC-d and prt genes by polymerase chain reaction in multiplex format. **Letters in Applied Microbiology**. 42(2):149-154. 2006.
- MALKAWI, H. I.,GHARAIBEH, R. Multiplex PCR for the direct detection of Salmonella enterica from chicken, lamb and beef food products. **Journal of Basic Microbiology**. 43(4):328-336. 2003.
- MARTINEZ, M. B.,TADDEI, C. R. Métodos de Diagnóstico in Microbiologia *In Microbiologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, 4 ed., 117-125. 2005.
- MOTARJEMI, Y.,KAFERSTEIN, F. K. Global estimation of foodborne diseases. **World Health Statistics Quarterly**. 50(1-2):5-11. 1997.
- MSOFFE, P. L. *et al.*, Differences in resistance to Salmonella enterica serovar Gallinarum infection among indigenous local chicken ecotypes in Tanzania. **Avian Pathology**. 35(4):270-276. 2006.
- NÓGRÁDY, N. *et al.*, Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**. 127:162-167. 2008
- NUNES *et al.*, Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças e cortes de frangos comercializados em Goiânia-GO. **Anais da Escola de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás**. 25(2):1-5. 1995

- OCHIAI, R. L. *et al.*, A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. **Bull World Health Organ**. 86(4):260-268. 2008.
- OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático**, 2 ed. Ulbra, Canoas. 2000.
- OPAS/OMS, Organização Pan-Americana de Saúde, Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. **Curso de sensibilização**. 159p. 2008
- O'REAGAN, E. *et al.*, Development of a real-time *multiplex* PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**. 8:156. 2008
- ORNSKOV, D. *et al.*, Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical swabs using a high-throughput real-time PCR-based method. **Clinical Microbiology and Infection**. 14(1):22-28. 2008.
- PACE, F. *et al.*, *Salmonella enteritidis* pericarditis: case report and review of the literature. **Ann Ital Med Int**. 17(3):189-192. 2002.
- PARRY, C. M. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever *In Salmonella infections - Clinical, immunological and molecular aspects*. P. Mastroeni and D. Maskell, University Press, Cambridge, ed., 381. 2006.
- PEI, Y. *et al.*, Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 61(1):58-64. 2008.
- PERESI, J. T. *et al.*, [Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella enteritidis*]. **Revista Saúde Pública**. 32(5):477-483. 1998.
- PIERROTTI, L. C. *et al.*, Osteomyelitis by *Salmonella enteritidis* and sickle cell hemoglobinopathy. Report of a case and review of the literature. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina em São Paulo**. 51(3):96-98. 1996.
- POPE, M. J., CHERRY, T. E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**. 79(9):1351-1355. 2000.
- PREBAF. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - Relatório do monitoramento e da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* e *Salmonella* isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2008.
- QUINN, P. J. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolf Publishing, England. 1994.

- RABSCH, W. *et al.*, Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. **Emerging Infectious Disease**. 6(5):443-448. 2000.
- RABSCH, W. *et al.*, Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**. 3(3):237-247. 2001.
- RALL, V. L. M. *et al.*, Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**. 36:147-150. 2005.
- RICHTER-DAHLFORS, A. *et al.*, Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **The Journal of Experimental Medicine** 186(4):569-580. 1997.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W., **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2006.
- SANO, G. *et al.*, Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. **Journal of Bacteriology**. 189(22):8224-8232. 2007.
- SANTOS, F. B. *et al.*, Genotypes, serotypes, and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolated from commercial North Carolina turkey farms. **Journal of Food Protection®**. 70(6):1328-1333. 2007.
- SANTOS, L. R. *et al.*, *Salmonella* enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. 16(102/103):93-99. 2002.
- SARRIA, J. C. *et al.*, *Salmonella* enteritidis brain abscess: case report and review. **Clin Neurol Neurosurg**. 102(4):236-239. 2000.
- SCHUURMAN, T. *et al.*, Feasibility of a molecular screening method for detection of *Salmonella* enterica and *Campylobacter jejuni* in a routine community-based clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. 45(11):3692-3700. 2007.
- SEO, K. H. *et al.*, Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella* typhimurium. **Journal of Food Protection®**. 62(5):431-437. 1999.
- SIEVERT, V. *et al.*, High throughput cloning with restriction enzymes. **Methods in Molecular Biology**. 426:163-173. 2008.
- STROCKBINE, N. A. *et al.*, Molecular epidemiologic techniques in analysis of epidemic and endemic *Shigella dysenteriae* type 1 strains. **The Journal Infectious Disease**. 163(2):406-409. 1991.

- SURDEANU, M. *et al.*, Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Shigella flexneri* strains isolated in Romania. **European Journal of Epidemiology**. 18(7):703-710. 2003.
- TRABULSI, L. R. *et al.*, **Microbiologia**, 4 ed. Atheneu, São Paulo. 2005.
- TSENEVA, G. Y. *et al.*, New approaches to detect and assess the pathogenicity of clinical strains of *Yersinia* spp. based on molecular biology techniques. **Advanced Experimentl in Medicine Biology**. 529477-480. 2003.
- VIDAL, J. E. *et al.*, Liver abscess due to *Salmonella enteritidis* in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 45(2):115-117. 2003.
- YU, C. Y. *et al.*, Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm. **Journal of Clinical Microbiology**. 46(2):522-526. 2008.
- ZHANG, H. *et al.*, Localization analysis of attenuated *Salmonella typhimurium* with oral immunization. **Wei Sheng Wu Xue Bao**. 48(1):80-84. 2008.
- ZHOU, D. *et al.*, A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Molecular Microbiology**. 39(2):248-259. 2001.
- ZHOU, D., GALAN, J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. **Microbes and Infection**. 3(14-15):1293-1298. 2001.



*“Finis coronat opus”*