



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIEL SANTOS PINTO SILVA

**DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE *Salmonella* spp. E  
*Salmonella Enteritidis* EM CARÇAÇAS DE FRANGO POR  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

---

Londrina  
2008

DANIEL SANTOS PINTO SILVA

**DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE *Salmonella spp.* E  
*Salmonella Enteritidis* EM CARÇAÇAS DE FRANGO POR  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza C. R. M. de Oliveira

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

S586d Silva, Daniel Santos Pinto.

Detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Salmonella Enteritidis* em  
carcaças de frango por reação em cadeia da polimerase / Daniel Santos  
Pinto Silva. – Londrina, 2008.  
53f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual  
de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação  
em Ciência de Alimentos, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Ave – Carcaça – Doenças –  
Teses. 3. Salmonela enteritidis – Teses. 4. Salmonela spp – Teses. I.  
Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de  
Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós – Graduação  
em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

DANIEL SANTOS PINTO SILVA

**DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE *Salmonella spp.* E *Salmonella*  
*Enteritidis* EM CARÇAÇAS DE FRANGO POR REACÇÃO EM CADEIA  
DA POLIMERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.a. Dra. Tereza Cristina R.M. de Oliveira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof.a. Dra. Leda Maria Koelblinger Sodr e  
UEL – Londrina – PR

---

Prof.a. Dra. Vanerli Beloti  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 29 de maio de 2008.

## **DEDICATÓRIA**

A Regis e Regina, meus pais, que sempre me apoiaram, incentivaram e serviram de exemplo e a meu irmão e amigo, Rafael.

## AGRADECIMENTOS

Meu Deus;

A Universidade Estadual de Londrina, pelas oportunidades;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro;

A minha orientadora Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela disponibilidade, paciência, incentivo, comentários críticos e dedicação;

Aos professores do programa de pósgraduação em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido e dedicação;

Às Professoras Dra. Leda Maria Koelblinger Sodré e Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pelas orientações no início do trabalho com biologia molecular e montagem do laboratório;

Aos Professores Dr. Massami Shimokomaki e Dra. Vanerli Beloti, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação;

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela disponibilidade de seus equipamentos;

A Iliana Del Rocío Alcocer Negrete e a Luciana Bill Mikito Kottwitz, pela disponibilização de isolados de *Salmonella* e de informações relevantes ao trabalho;

À Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues e a Eliane Moura Falavina dos Reis, do Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, pela sorotipagem dos isolados de *Salmonella*;

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL), pela colaboração;

Aos colegas de laboratório, pelas discussões, sugestões, auxílio e companheirismo;

Aos colegas do curso, pelo companheirismo e amizade durante os anos do mestrado;

Aos amigos Alexandre Morey e Márcio Sukanuma, pelo convívio, companheirismo e por todos os momentos compartilhados ao longo desses anos de graduação e pós-graduação;

Aos amigos. Principalmente àqueles que por qualquer motivo permaneceram por perto, Alexandre Garcia, Ariane, Armando, Carla, Fernando Yuldi, Flávio, Ivana, Juliana, Larissa, Leandro, Marisa, Maurício, Paulo e Siliane pelos bons momentos compartilhados;

A minha família que, perto ou distante, sempre me apoiou;

A todos que tenham auxiliado de alguma forma na realização deste trabalho.

SILVA, Daniel Santos Pinto. **Detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Samonella Enteritidis* em carcaças de frango por reação em cadeia da polimerase**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

Um aumento de salmonelose humana causada pelo sorovar Enteritidis relacionado com o consumo de carne de aves, ovos e derivados foi observado em todo o mundo nos últimos anos. A implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), embora tenha diminuído o número de aves contaminadas, não foi capaz de eliminar o problema. A salmonelose é a doença alimentar de origem bacteriana mais prevalente no Paraná e o sorovar Enteritidis foi responsável por aproximadamente 80% dos surtos ocorridos nesse Estado, entre 1999 e 2006. Como *S. Enteritidis* não provoca sintomas clínicos graves nas aves, o monitoramento da sua presença em alimentos é muito importante para o controle da doença humana. Os métodos convencionais de isolamento de *Salmonella* em alimentos, água ou amostras ambientais são muito demorados. Devido à rapidez, especificidade e sensibilidade, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido padronizados para detecção e identificação de *Salmonella* em alimentos. O objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio PCR multiplex para a detecção de *Salmonella spp.* e identificação simultânea de *Salmonella Enteritidis* em carcaças de frango. A PCR foi padronizada utilizando-se os pares de iniciadores INV A, específico para *Salmonella spp.* e IE1, específico para o sorovar Enteritidis, resultando em fragmentos amplificados de DNA alvo específicos de 796 e 316 pares de base, respectivamente. A especificidade do ensaio PCR padronizado, testada com culturas puras de diferentes sorovares de *Salmonella* e outras espécies bacterianas, foi de 100%. Após 24 h de enriquecimento não seletivo foi possível detectar aproximadamente 1 unidade formadora de colônia (UFC) de *Salmonella* por 10 g de pele de frango artificialmente contaminada. Das 66 amostras de carcaça de frango analisadas, adquiridas no comércio de Londrina, nove (13,0%) estavam contaminadas com *Salmonella spp.* A presença dessa bactéria foi confirmada pelo método tradicional de cultura e identificados os sorovares Schwarzengrund e Montevideo, respectivamente, em seis e em três amostras. Através da PCR foram detectados fragmentos de DNA específicos que confirmaram a presença do gênero *Salmonella*, porém não do sorovar Enteritidis. A PCR multiplex padronizada apresentou sensibilidade e especificidade para detectar o gênero *Salmonella* e, simultaneamente identificar o sorovar Enteritidis, em carne de frango, após 24 horas de análise.

**Palavras-chave:** *Salmonella spp.* *Salmonella Enteritidis*. PCR. Carcaça de frango.

SILVA, Daniel Santos Pinto. **Detection of *Salmonella* spp. and *Samonella Enteritidis* in chicken carcasses by multiplex polymerase chain reaction.** 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Londrina, Londrina, 2008.

## ABSTRACT

An increase in human *salmonellosis* caused by serovar Enteritidis related to consumption of poultry products was observed worldwide in the last years. Safety measures have been adopted to control this serovar. The implementation of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) System was not able to eliminate the problem although it has considerably reduced the number of infected chickens. *Salmonellosis* is the most frequent bacterial foodborne disease in Parana State, Brazil and serovar Enteritidis caused approximately 80% of outbreaks occurred between 1999 and 2006. *S. Enteritidis* causes subclinical infection in chickens. Thus, the constant checking of *Salmonella* contamination in the food chain is essential to control human disease. *Salmonella* detection in food, water or environmental samples by traditional methods is labor-intensive and time-consuming. Molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR), are rapid, specific and sensitive and several methods have been developed to detect and identify *Salmonella* in foods. The objective of this study was to develop a multiplex PCR for detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella Enteritidis* in chicken carcasses. A PCR was developed using *Salmonella* genus-specific primers INVA and serovar Enteritidis-specific primers IE1, which produce specific DNA fragments of 796 and 316 base-pairs, respectively. The standardized PCR was tested with different isolates of *Salmonella* and other bacterial species and the specificity was 100%. *Salmonella* was detected from chicken skin artificially contaminated with approximately 1 colonyforming unit (CFU) of *Salmonella* per 10 g, after 24 h of non-selective enrichment. *Salmonella* spp. was detected in nine (13%) of 66 analyzed chicken carcasses purchased from local retail market. The presence of *Salmonella* was confirmed by traditional culture method and serovars Schwarzengrund and Montevideo were identified in six and three carcass samples, respectively. Specific DNA fragments of the PCR confirmed the presence of genus *Salmonella*, but not serovar Enteritidis. The standardized multiplex PCR was found to be sensitive and specific on the detection of genus *Salmonella* and simultaneous identification of serovar Enteritidis in chicken meat after 24 hours of analysis

**Keywords:** *Salmonella* spp. *Salmonella Enteritidis*. PCR. Chicken carcass

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 9  |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....   | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 11 |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 12 |
| 3.1 <i>SALMONELLA</i> COMO AGENTE DE TOXINFECÇÕES ALIMENTARES.....  | 12 |
| 3.1.1 Programas de Controle .....   | 15 |
| 3.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> EM ALIMENTOS .....   | 17 |
| 3.3 DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> POR PCR .....   | 18 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 25 |
| 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS .....  | 25 |
| 4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-PCR.....   | 25 |
| 4.2.1 Extração de DNA dos Isolados.....   | 25 |
| 4.2.2 Padronização da PCR Multiplex.....  | 26 |
| 4.2.3 Análise dos Produtos de Amplificação .....  | 27 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ENSAIO PCR PADRONIZADO .....   | 27 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DO ENSAIO PCR PADRONIZADO EM CARÇAÇA DE FRANGO<br>ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA .....   | 28 |
| 4.4.1 Contaminação das Carcaças .....   | 28 |
| 4.4.2 Análise Microbiológica das Amostras.....  | 28 |
| 4.4.3 Extração de DNA e PCR das Amostras Artificialmente<br>Contaminadas.....   | 29 |
| 4.5 ANÁLISE DE CARÇAÇA DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADA .....   | 29 |
| <b>5 ARTIGO: “Padronização de PCR para detecção simultânea de<br/><i>Salmonella spp.</i> e <i>Samonella Enteritidis</i> em carne de frango”</b> ..... | 30 |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 41 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 42 |

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças de origem alimentar permanecem como um grande problema de saúde pública além de resultar em perda econômica para a indústria de alimentos e impor custos financeiros à saúde pública (ELLINGSON et al., 2004).

*Salmonella spp.* são parasitas intracelulares facultativos que invadem a mucosa intestinal e são transmitidos aos seres humanos, principalmente pela água, carne de aves, ovos e derivados (HASSAN et al., 2004). Podem colonizar e causar doença em uma grande variedade de animais utilizados ou não na alimentação humana. Atualmente, o gênero inclui mais de 2500 sorovares e, embora todos possam ser considerados potenciais patógenos humanos, a grande maioria das infecções é causada por aproximadamente 200 sorovares (ZHAO et al., 2006).

A partir de 1970, no Brasil e em outros países, foi observado um aumento considerável e constante de surtos de salmonelose, além do aumento do isolamento de determinados sorovares (BAIRD-PARKER, 1990; KAKU et al., 1995; UYTENDAELE et al., 1998). *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* têm sido os sorovares mais isolados de casos de infecção alimentar humana nos Estados Unidos (OLIVEIRA et al., 2002).

Até o início de 1990 no Brasil, *S. Enteritidis* era raramente isolada de infecções humanas. Taunay et al. (1996), em um estudo realizado entre 1970 e 1990 com isolados de *Salmonella* enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo para sorotipagem, mostraram que *S. Enteritidis* foi identificada em 0,37% e 0,85% das amostras de fontes humanas e não humanas analisadas, respectivamente. Porém, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* de origem humana passou de 1,2% para 64,9% entre 1991 e 1995 (TAVECHIO et al., 1996).

No Paraná, a partir de 1995, a salmonelose passou a ser a principal doença transmitida por alimentos e analisando-se os surtos ocorridos entre 1999 e 2006, o sorovar *Enteritidis* foi o predominante tanto nas amostras de pacientes (74,8%) quanto nos alimentos envolvidos nos surtos (80,0%) (ALCOCER, 2004; KOTTWITZ, 2008).

Vários alimentos já foram associados a surtos de salmonelose, porém, os produtos de origem avícola têm sido as principais fontes de infecção e a

predominância do sorovar Enteritidis está relacionada ao consumo de carne de frango e de ovos (WHO, 2002; WHO, 2006).

De acordo com a União Brasileira de Avicultura (UBA, 2008), o Brasil é o segundo produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, sendo o Estado do Paraná o maior produtor do Brasil. Em 2007, a produção foi de aproximadamente 10,25 milhões de toneladas, com cerca de 32% deste total exportado e o consumo per capita passou de 2,3 kg, em 1971, para 37,823 kg, em 2007, tornando-se o Brasil um dos maiores consumidores de carne de frango do mundo (UBA, 2008). As barreiras sanitárias têm exigido o controle da contaminação do plantel, principalmente, por *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.*

Aves podem ser portadoras assintomáticas de *Salmonella* (FRANCO; LANDGRAF, 2002) e a prevenção da transmissão a humanos através de alimentos, em especial de produtos de origem avícola, deve ser uma prioridade (OLIVEIRA; SILVA, 2000). Portanto, a detecção de *Salmonella spp.* e a diferenciação simultânea do sorovar Enteritidis vêm de encontro às necessidades dos Laboratórios de Diagnóstico e Controle de Qualidade de alimentos na obtenção de resultados rápidos.

Métodos convencionais de cultura usados para detecção de *Salmonella* em alimentos, normalmente requerem de cinco a onze dias e incluem enriquecimento não seletivo seguido de enriquecimento seletivo e plaqueamento em ágar seletivo e diferencial (AOAC, 1995). As colônias suspeitas são confirmadas bioquimicamente (WHYTE et al., 2002) e o sorovar e o fagotipo são identificados em laboratório de referência, o que dificulta uma adequada investigação epidemiológica de surtos.

Mais recentemente, métodos alternativos para detecção de *Salmonella* em alimentos, com e sem diferenciação de sorovar, têm sido padronizados, entre eles, técnicas de imunoensaio, hibridização de ácido nucléico e reação em cadeia da polimerase (PCR) (WAN et al., 2000).

A PCR (MULLIS; FALLONA, 1987) tem provado ser uma técnica alternativa específica e sensível para detecção de *Salmonella*, fornecendo resultados com precisão em torno de 24 horas. Além disso, observou-se que a PCR foi a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente, podendo ser empregada como ferramenta de diagnóstico em laboratórios clínicos (FLÔRES et al., 2001; LI, MUSTAPHA, 2004).

## 2 OBJETIVOS GERAL

### 2.1 OBJETIVOS GERAL

O objetivo desse trabalho foi padronizar um ensaio de PCR multiplex para detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Salmonella Enteritidis* em carcaças de frango.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir os pares de iniciadores e as melhores condições de amplificação de DNA a serem utilizadas na padronização de PCR para detecção individual de *Salmonella spp.* e *Salmonella Enteritidis* em culturas puras.

Padronizar PCR multiplex para detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Salmonella Enteritidis* em culturas puras.

Testar o ensaio PCR padronizado para a detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Salmonella Enteritidis* em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *SALMONELLA* COMO AGENTE DE TOXINFECÇÕES ALIMENTARES

O gênero *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, engloba mais de 2500 sorovares e a maioria deles não pode ser distinguida por testes bioquímicos. A distinção é feita baseada em suas fórmulas antigênicas, que são definidas, mantidas e atualizadas pelo “World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella” no Instituto Pasteur, Paris, França. A classificação atual segue o Esquema de Kauffmann-White, um documento que tem todas as fórmulas antigênicas de *Salmonella* já reconhecidas até o presente. Atualmente, o sistema de nomenclatura usado no Centro de Prevenção e Controle de Doenças, Atlanta (CDC -“Centers for Disease Control and Prevention”) é baseado em recomendações do WHO Collaborating Center. De acordo com o sistema do CDC o gênero *Salmonella* contém duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. Uma terceira espécie *Salmonella subterranea* foi reconhecida em 2005 e o CDC poderá incorporá-la em seu sistema de nomenclatura num futuro próximo. *Salmonella enterica* apresenta as subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (BRENNER et al., 2000; BELL, KYRIAKIDES, 2001; POPOFF, LE MINOR, 2001; TAVECHIO et al., 2004; FORSHELL, WIERUP, 2006; SU, CHIU, 2007) Tabela 1.

**Tabela 1** – Nomenclatura do gênero *Salmonella*.

| <b>Espécies</b>       | <b>Subespécies</b>          | <b>Número de Sorovares</b> |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>S. enterica</i>    | <i>enterica</i> (ou I)      | 1504                       |
|                       | <i>salamae</i> (ou II)      | 502                        |
|                       | <i>diarizonae</i> (ou IIIb) | 333                        |
|                       | <i>arizonae</i> (ou IIIa)   | 95                         |
|                       | <i>houtenae</i> (ou IV)     | 72                         |
|                       | <i>indica</i> (ou VI)       | 13                         |
| <i>S. bongori</i>     | (V)                         | 22                         |
| <i>S. subterranae</i> |                             |                            |
| <b>TOTAL</b>          |                             | <b>2541</b>                |

**Fonte:** adaptado de Su e Chiu, (2007).

As doenças causadas por *Salmonella spp.* são subdivididas em febre tifóide, causada por *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhi, febres entéricas, causadas por *S. enterica* subesp. *enterica* sorovar Paratyphi A, B e C e gastroenterites ou salmoneloses, causadas pelos outros sorovares (FORSHELL; WIERUP, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a salmonelose é uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos devido ao número de pessoas afetadas anualmente e à conseqüente perda econômica decorrente de tratamentos médico-hospitalares e da necessidade de reprocessamento e ou destruição de alimentos contaminados (KAKU et al., 1995; WHO, 2005).

A ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.* em diversos países chamou a atenção para fontes comuns de infecção (FLÔRES et al., 2001). *Salmonella*, que tem o trato intestinal de animais como habitat, entra na cadeia alimentar humana principalmente através de produtos agrícolas e alimentos de origem animal, incluindo carnes de aves domésticas, bovina e suína, queijo, maionese, alimentos infantis e frutos do mar (GOODING; CHOUDARY, 1999).

Frangos podem ser reservatórios de *Salmonella* e grande número de surtos de doenças humanas têm sido associados a produtos de origem avícola (OLAH et al., 2005). Embora carne de frango e ovos continuem sendo importantes veículos de transmissão de *Salmonella spp.*, tem ocorrido um aumento na incidência

de *Salmonella* em frutas e vegetais frescos nos Estados Unidos. Esse aumento está relacionado a práticas agrícolas como irrigação com água contaminada e fertilização com adubo orgânico (ESPINOZA-MEDINA et al., 2006; LEE et al., 2006). Fezes humanas e de animais infectados são importantes fontes de contaminação do ambiente e de alimentos devido à possibilidade de excreção de grande quantidade de *Salmonella* nesse material (BAIRD-PARKER, 1990).

*Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovares Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Agona, Newport, Infantis, Panamá, Saintpaul e Weltevreden são os mais frequentemente encontrados na maioria dos países. Durante décadas *S. Typhimurium* predominou como o responsável pelas infecções humanas, porém nos últimos anos, em muitos países, *S. Enteritidis* tem sido o sorovar mais comumente identificado nas salmoneloses associadas ao consumo de ovos, carne de aves e derivados contaminados (UYTTENDAELE et al., 1998; WHYTE et al., 2002; OLAH et al., 2005; SEO et al., 2006; WHO, 2006).

No Brasil, os surtos de doenças transmitidas por alimentos não são analisados sistematicamente, assim o número real de casos esporádicos e de surtos de salmonelose humana é desconhecido (KAKU et al., 1995; GASPARETTO et al., 2001).

No Paraná, a partir de 1995, a salmonelose passou a ser a principal doença transmitida por alimentos. Entre 1999 e 2006, 52 municípios dos 399 que compõem o Estado do Paraná notificaram surtos de salmonelose. O sorovar Enteritidis foi identificado em 74,8% dos isolados provenientes de pacientes e em 80,0% dos isolados de alimentos envolvidos nos surtos (KOTTWITZ, 2008). De 25 isolados de *Salmonella* provenientes de carcaças de frango comercializadas em Londrina, 4% pertenciam ao sorovar Infantis, 8% ao Worthington, 16% ao Braenderup e 72% ao sorovar Enteritidis (ALCOCER et al., 2006).

A tendência à emergência de *Salmonella Enteritidis* como agente causal de toxinfecções alimentares e a rápida globalização da produção de alimentos têm aumentado a possibilidade de incidentes nacionais e internacionais envolvendo alimentos contaminados (ZHAO et al., 2006). Assim o desenvolvimento de técnicas rápidas e confiáveis de detecção desse patógeno em alimentos tornou-se indispensável.

### 3.1.1 Programas de Controle

Muitos países experimentaram, por um período de tempo, um crescimento contínuo de doenças de origem alimentar, que resultou na preocupação das autoridades governamentais, dos consumidores e das indústrias alimentícias com o fornecimento de alimentos inócuos. Esta situação gerou a necessidade de padronização de análises rápidas e confiáveis na detecção de patógenos e toxinas. Assim, sofisticados aparelhos e diferentes “kits” comerciais de diagnóstico foram lançados no mercado, o que levou a uma preocupação das autoridades em relação à aprovação desses novos métodos microbiológicos alternativos de controle dos alimentos (QVIST, 2007).

Programas de controle de contaminação de alimentos para serem eficientes devem alcançar seus objetivos com baixo custo. A eficácia pode ser avaliada com base em dados da Vigilância Sanitária e para avaliar quantitativamente os efeitos das intervenções usadas, são necessários modelos matemáticos de avaliação de risco. Viabilidade econômica, assim como, estudos de custo-benefício são importantes para a avaliação econômica da eficiência dos programas (MAIJALA et al., 2005).

Muitas pesquisas e tentativas nacionais e internacionais de implementar estratégias de controle foram realizadas, mas apesar disto a incidência de salmonelose humana na maioria dos países permanece alta, com exceção da Suécia, que permanece livre de casos de infecção autóctone (WEGENER et al., 2003). Isto pode ser atribuído ao Programa Sueco de Controle de *Salmonella* iniciado em 1991 com o objetivo de estabelecer isenção de infecção por *Salmonella* em animais destinados à produção de alimentos. Esse programa é baseado nos princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) de fábricas de ração. Um passo importante é o controle e a quarentena dos materiais crus que, se contaminados com *Salmonella*, são tratados com ácidos orgânicos e re-testados, antes de serem incorporados à mistura da ração (SALOMONSSON et al., 2005). Além disso, todo plantel infectado com *Salmonella*, independente do sorovar, é destruído (NVI, 2001).

Na Finlândia, o controle de salmonelas está em vigor desde 1960 através do Programa Finlandês de Controle de *Salmonella*, (FSCP -“Finnish

*Salmonella* Control Programme”), que funciona de maneira conveniente em proteger a saúde pública naquele país (MAIJALA et al., 2005).

Em 1999, foi criado o NordVal com o objetivo de avaliar o desempenho e a esfera de ação da aplicação de métodos microbiológicos alternativos para análise de alimentos nos países Nórdicos. Entre os métodos já validados estão ELISA, PCR e outros métodos baseados em DNA para *Salmonella*, *Campylobacter* e *Listeria*, além de métodos alternativos baseados em cultivo (QVIST, 2007).

Na União Européia, a Diretriz de Zoonoses foi uma tentativa de iniciar um amplo controle de zoonoses de origem alimentar, particularmente *Salmonella* em frangos e galinhas poedeiras. A maioria dos países da União Européia constatou que não poderia implementar a Diretriz, a qual não permite o uso de vacinas, drogas antimicrobianas, ou ambas, como elementos no programa de controle de *Salmonella*, tal limitação foi vista como um obstáculo por alguns países (WEGENER et al., 2003).

Nos Estados Unidos, o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS -“Food Safety and Inspection Service”) é o órgão do Departamento de Agricultura responsável por proteger consumidores garantindo que carnes, aves e produtos de ovos sejam seguros, saudáveis e corretamente rotulados através de inspeções nacionais e controle de importação (USDA-FSIS, 2001).

No Brasil, a partir de 1994, foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) considerando a importância da produção avícola brasileira no contexto nacional e internacional, a necessidade de normatização das ações de acompanhamento sanitário, observando o processo de globalização mundial em curso, e a necessidade do estabelecimento de programas de cooperação entre as instituições públicas e privadas. O PNSA desenvolveu programas sanitários para controle dos plantéis para doença de Newcastle e contaminação por *Salmonella* e *Mycoplasma* (BRASIL, 1994). Em 2003, o MAPA estabeleceu o Programa Nacional de Redução de Patógenos. O principal objetivo desse programa é construir um sistema de informações sobre contaminação de frangos e perus com *Salmonella* em todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e, com

isso, reduzir gradativamente a contaminação de aves por *Salmonella*. (BRASIL, 2003).

A legislação brasileira estabelece que, em alimentos destinados ao consumo humano, *Salmonella spp.* deve estar ausente em 25 gramas ou mililitros de alimento com exceção de carne e miúdos de aves crus (BRASIL, 2001).

### 3.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA* EM ALIMENTOS

O método de cultivo tradicional para detecção de *Salmonella*, descrito pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC), requer enriquecimento não seletivo seguido de enriquecimento seletivo em meio líquido e plaqueamento em meio sólido seletivo e diferencial. As colônias presuntivas são avaliadas bioquimicamente e confirmadas sorologicamente com anti-soro polivalente somático e flagelar. O sorovar e o fagotipo são identificados em laboratório de referência. Este método é laborioso e demanda muito tempo, necessitando-se de cinco dias ou mais para a confirmação segura da ausência da bactéria na amostra (AOAC, 1995; BEUMER et al., 1991) e a sensibilidade do método ainda pode ser baixa para amostras com baixos níveis de contaminação (ESPINOZA-MEDINA et al., 2006). Investigações de surtos e estudos com voluntários mostraram que certos isolados de *Salmonella* podem causar doença mesmo em dose infectante muito baixa (RYCHLÍK et al., 1999).

A demora no tempo de confirmação do patógeno pode resultar no aumento do tempo de armazenamento ou na distribuição do produto, à espera do resultado final da análise, aumentando o risco de infecções. Assim sendo, o controle da qualidade de alimentos e o diagnóstico laboratorial de infecção requerem métodos rápidos, sensíveis e específicos (ESPINOZA-MEDINA et al., 2006). Uma vez que a maioria dos sorovares de *Salmonella* é considerada potencialmente patogêna, o desenvolvimento de um método rápido e confiável para detecção de *Salmonella* com preparo simples de amostra é essencial (AHN; WALT, 2005).

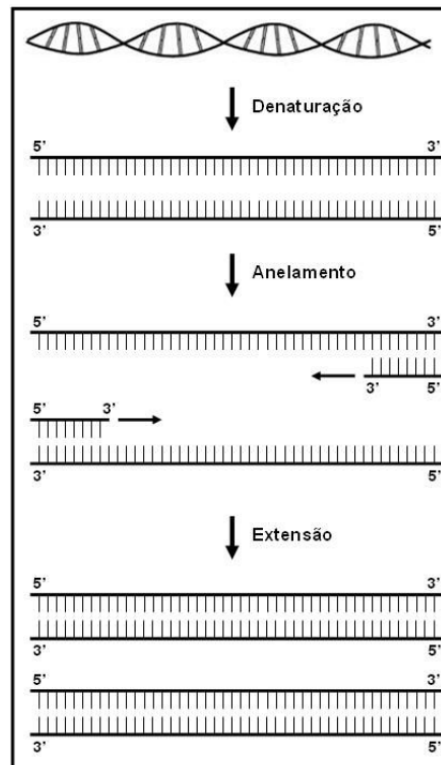
Várias técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas, cada qual com vantagens específicas em termos de rapidez, sensibilidade, especificidade, baixo custo e facilidade de uso (GOODING; CHOUDARY, 1999).

As diversas alternativas desenvolvidas são hibridização de DNA (D'AOUST et al., 1995; MIYAMOTO et al., 1998), reação em cadeia da polimerase (PCR), técnicas que empregam anticorpo fluorescente (BLACKBURN et al., 1994; KEITH, 1997), aglutinação em látex, radioimunoensaio, imunodifusão e ensaios imunoquímicos (BRIGMON et al., 1992; SHAW et al., 1998; ALCOCER e OLIVEIRA, 2003). Esses métodos alternativos são atrativos por apresentarem a vantagem da rapidez na obtenção de resultados.

### 3.3 DETECÇÃO DE *SALMONELLA* POR PCR

Avanços na tecnologia de biologia molecular têm permitido identificações microbianas mais confiáveis (ESPINOZA-MEDINA et al., 2006). A reação em cadeia da polimerase PCR (Polymerase Chain Reaction) (MULLIS; FALLONA, 1987) é uma técnica que tem sido extensivamente investigada (GOODING; CHOUDARY, 1999). Este método é baseado na amplificação de uma seqüência alvo de DNA específica e análise do produto de amplificação (MULLIS; FALLONA, 1987).

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA polimerase termoestável. Esta enzima sintetiza uma seqüência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento iniciador (em inglês "primer"), complementar em relação às extremidades da seqüência que se deseja amplificar, se anele a uma das fitas do DNA no ponto escolhido para início da síntese. Os iniciadores definem a seqüência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada seqüência de DNA com bilhões de cópias (Fig. 1). Os fatores mais importantes para a obtenção de bons resultados incluem a purificação do DNA, a escolha adequada dos iniciadores e as condições em que os ciclos de amplificação ocorrem (MULLIS; FALLONA, 1987).



**Figura 1** – Os 3 passos da reação em cadeia da polimerase. Passo 1, desnaturação: a mistura com DNA alvo é aquecida a 95°C permitindo que a dupla fita de DNA desnature e separe em duas fitas simples. Passo 2, anelamento: a mistura é resfriada entre 50 e 60°C para permitir que os iniciadores se hibridizem (anelem) às fitas simples de DNA. Passo 3, extensão: a temperatura é elevada a 72°C para permitir que a Taq polimerase adicione desoxinucleotídeos complementares ao DNA alvo e complete a amplificação. Estes três passos são repetidos 30 a 40 vezes para replicar  $2^n$  cópias da região de interesse do DNA alvo, onde n é o número de ciclos

**Adaptado de:** Garcia e Ma (2005)].

A técnica de PCR é uma das mais promissoras para detecção e identificação rápida de bactérias numa ampla variedade de amostras, tendo sido aplicada com sucesso na detecção e identificação de microrganismos patogênicos em amostras clínicas, ambientais e em alimentos (HASSAN et al., 2004).

Testes com PCR têm sido aplicados com sucesso para detectar patógenos bacterianos transmitidos por alimentos, incluindo *Salmonella* (WAN et al., 2000). As principais vantagens são: aumento de sensibilidade e menor tempo requerido para processar as amostras no laboratório quando comparado ao método tradicional de cultivo (WHYTE et al., 2002). Outra vantagem é que a PCR não é dependente da utilização de um substrato ou da expressão de antígenos, evitando

assim variações fenotípicas em padrões bioquímicos e falta de antígenos detectáveis (HOORFAR et al., 1999). A PCR também se transformou numa valiosa ferramenta de investigação de surtos de origem alimentar (ALCOCER et al., 2006).

Para que a PCR possa ser utilizada para o diagnóstico de salmonelose é necessário que sejam conhecidas seqüências de nucleotídeos de DNA específicas para *Salmonella spp*, para serem utilizadas como marcadores genéticos de gênero. Com a evolução, sorovares de *Salmonella* adquiriram muitos genes por transferência horizontal de plasmídios ou fagos. Alguns desses genes agora caracterizam sorovares e são, portanto, óbvios candidatos para o desenvolvimento de métodos baseados em análise de DNA (OLIVEIRA et al., 2002).

Várias metodologias de detecção de *Salmonella* por PCR já foram descritas utilizando pares de iniciadores para o gene *invA* (SALOMONSSON et al., 2005).

A invasão das células do epitélio intestinal é um passo importante no ciclo de patogenicidade de *Salmonella* (PORTER; CURTISS, 1997). A maioria dos genes envolvidos nesse processo está localizada em um local denominado de Ilha 1 de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI1 -“*Salmonella* Pathogenicity Island 1”) (HACKER et al., 1997). A SPI1 é altamente conservada no gênero *Salmonella* e codifica um sistema de secreção tipo III que exporta proteínas de membrana interna e externa em resposta a um contato bacteriano com células epiteliais (SALOMONSSON et al., 2005).

O gene *inv*, entre outros, está localizado na SPI-1 e é necessário para auxiliar na invasão de células não fagocíticas, como as células epiteliais da mucosa intestinal (HACKER et al., 1997).

Galán e Curtiss (1989) identificaram uma região com quatro genes para *Salmonella* Typhimurium, *invA*, *invB*, *invC* e *invD*, e relataram que isolados de *Salmonella* que possuíam os genes *inv* eram capazes de invadir cultura de células epiteliais. Porém, se o gene *invA* sofresse algum tipo de mutação, a expressão do operon *invABC* não ocorria e a linhagem virulenta perdia a capacidade de invadir o tecido.

O gene *invA* é o primeiro no operon *inv*, onde os genes *invA*, -B e -C estão arrançados na mesma unidade transcricional e o gene *invD* está localizado em uma unidade transcricional diferente (GALÁN et al., 1992).

Galán e colaboradores (1992) conceituaram que a função do gene *invA* foi a de aumentar a capacidade de invasão de *Salmonella* em células epiteliais e que a proteína InvA faz parte de uma família de proteínas, que possuem a função de transportar proteínas específicas através da membrana celular bacteriana.

A seqüência desse gene cromossomal é única para *Salmonella* e está amplamente distribuída, possivelmente, entre todos os sorovares de *Salmonella* (OLAH et al., 2005) podendo, portanto, ser utilizada como um marcador genético para o gênero.

O recente desenvolvimento e disponibilidade de termocicladores rápidos tem permitido o avanço da PCR tradicional. A PCR em tempo real, que utiliza corantes que fluorescem quando ligados inespecificamente a DNA dupla fita ou que empregam sondas de hibridização fluorescentes, pode apresentar resultados em menos de 12 horas e prover dados qualitativos e quantitativos sobre o patógeno alvo em amostras alimentares (ELLINGSON et al., 2004).

Liming e Bhagwat (2004) padronizaram pela primeira vez PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* em vegetais e frutas utilizando sondas “beacon” específicas. O teste apresentou sensibilidade de 4 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* por 25 g de alimento artificialmente contaminado após 16 horas de enriquecimento.

PCR em tempo real com simples extração de DNA por fervura para detecção de *Campylobacter jejuni* foi padronizada por Oliveira et al. (2005). O ensaio foi eficiente quando testado com carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.

Em um estudo que avaliou a detecção rápida de *Salmonella* em carne de frango contaminada e tratada com pressão hidrodinâmica, utilizando sonda “beacon” em PCR-tempo real, após 16-18 horas de enriquecimento não seletivo, foi possível detectar *Salmonella* nas amostras contaminadas com  $2 \pm 1$  UFC de *Salmonella* por 25 g de carne de frango (PATEL et al., 2006).

A PCR multiplex consiste na amplificação de várias seqüências alvo, simultaneamente, devido ao uso de vários iniciadores em uma mesma reação (CHAMBERLAIN et al., 1988; SAMBROOK, RUSSELL, 2001). Entre as vantagens, é uma técnica econômica, pois permite a detecção simultânea de diversos patógenos (VANTARAKIS et al., 2000). Esta técnica foi utilizada para identificar seqüências específicas de seis diferentes bactérias patogênicas simultaneamente, entre elas

*Salmonella* Typhimurium (KONG et al., 2002). PCR multiplex também foi utilizada por Vantarakis et al. (2000) para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em mexilhões na Grécia. Em um estudo realizado com amostras de carne, Kawasaki et al. (2005) utilizaram PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp., *Listeria monocitogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, encontrando resultados similares ao método tradicional de cultura.

Em um estudo realizado na Espanha, PCR multiplex foi utilizada para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação de fagotipos e sorovares mais comumente encontrados em amostras clínicas humanas. Quando a técnica foi aplicada em amostras de fezes, os sorovares prevalentes, Enteritidis e Typhimurium, foram detectados com uma sensibilidade de 93%, especificidade de 100% e eficiência de 98% (ALVAREZ et al., 2004).

PCR multiplex também foi utilizada em análise de presunto cozido para detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocitogenes*. O gene *invA* foi utilizado como marcador genético de *Salmonella*. Este ensaio provou ser um método simples e rápido para confirmação simultânea de supostas colônias dessas duas bactérias diretamente de meio sólido, sem prévia extração de DNA (JOFRÉ et al., 2005).

De acordo com Beja-Pereira e Almeida (2005), algumas variações da técnica de PCR são muito utilizadas em estudos de semelhança entre isolados. Os polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, ou RFLP, resultam da possibilidade de clivar o DNA através da utilização de enzimas de restrição que são capazes de reconhecer pequenas seqüências específicas. Atualmente, existem algumas centenas de enzimas de restrição disponíveis comercialmente. RFLP implica na amplificação por PCR da seqüência de interesse, sua digestão com a enzima de restrição adequada e a subsequente separação dos fragmentos obtidos num gel de agarose ou poliacrilamida. Como o DNA em solução é uma molécula carregada negativamente, os seus fragmentos deslocam-se sempre para o pólo positivo e a sua separação resulta das diferenças de tamanho (BEJA-PEREIRA; ALMEIDA, 2005).

Os polimorfismos de DNA amplificados ao acaso, ou RAPD fazem uso de iniciadores ditos arbitrários (pequenos e de seqüências aleatórias). Esta técnica é apropriada para identificar e distinguir genótipos de uma mesma espécie. Uma das vantagens do RAPD é que não se escolhe a região a ser amplificada, ao

contrário disso, utilizam-se iniciadores de seqüências arbitrárias de bases e analisam-se os produtos amplificados. Os polimorfismos amplificados são reconhecidos pela presença ou ausência de fragmentos num genótipo, em relação a outro (WILLIAMS et al., 1990).

Os polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados, ou AFLP, evoluíram a partir do RAPD. A técnica baseia-se na amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da clivagem do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição que deixam extremidades coesivas de seqüências reconhecidas, assim, é possível construir seqüências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominados adaptadores. Uma vez que a seqüência dos adaptadores e a do sítio de restrição são conhecidas, pode-se construir iniciadores específicos a essas seqüências (VOS et al., 1995).

Em um estudo realizado com isolados de *Salmonella* provenientes de carcaça de frangos comercializados em Londrina entre 1999 e 2000, Alcocer et al. (2006) utilizaram REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PCR, outras variações da PCR, para caracterização molecular dos isolados e discriminação dos sorovares. A REP-PCR forneceu um perfil único de bandas, constante e específico para cada sorovar analisado, parecendo ser um método atrativo a ser utilizado no futuro para a discriminação preliminar dos sorovares de *Salmonella* mais freqüentemente isolados (ALCOCER et al., 2006).

Recentemente, Tunung et al. (2007) utilizaram a ERIC-PCR para caracterizar, sorotipar e estudar a relação entre as espécies e os sorovares de *Salmonella* isolados em alimentos vendidos nas ruas e em amostras clínicas na Malásia. Os autores relataram que todos os isolados eram da espécie *Salmonella* enterica e a ERIC-PCR conseguiu diferenciar 19 sorovares.

Embora a PCR tradicional e suas variações representem um grande avanço em termos de velocidade, sensibilidade e especificidade, a complexa composição da matriz alimentar pode interferir na reação e diminuir a sensibilidade das análises (SALOMONSSON et al., 2005; ESPINOZA-MEDINA et al., 2006). Partículas e substâncias solúveis podem ser removidas por centrifugação de baixa ou alta velocidade, porém, bactérias podem ser perdidas nesse processo levando a uma diminuição da sensibilidade da técnica (FLÔRES et al., 2001).

Uma etapa relativamente longa de pré-enriquecimento é normalmente necessária para fornecer um nível de sensibilidade aceitável antes da PCR devido à baixa contaminação bacteriana observada frequentemente em vários produtos alimentícios frescos. Esse pré-enriquecimento, não-seletivo e/ou seletivo, tem sido aplicado na detecção de muitos patógenos bacterianos, inclusive *Salmonella*, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e diluir substâncias inibidoras da reação (OLIVEIRA et al., 2002; ESPINOZA-MEDINA et al., 2006).

Neste contexto observa-se que a PCR aparece como técnica alternativa rápida, sensível e específica para detecção de patógenos e pode ser utilizada como uma ferramenta a mais em laboratórios de diagnóstico de surtos, como também de Controle de Qualidade de alimentos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Isolados de *Salmonella* dos sorovares Typhimurium, Typhi, Infantis, Montevideo, Agona, Dublin, Newport, dois isolados do sorovar Enteritidis e isolados de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram adquiridos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR (UEL). Isolados de *Salmonella* dos sorovares Enteritidis PT 1, Enteritidis PT 7, London, Albany, Corvallis, Oranienburg, Mbandaka, Saintpaul, Schwarzengrund e Anatum foram fornecidos pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba) e sorotipados e fagotipados na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ (FIOCRUZ). *Salmonella Enteritidis* IAL1132 adquirida no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP, foi usada como controle positivo.

### 4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE -PCR

#### 4.2.1 Extração de DNA dos Isolados

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada conforme SWANENBURG et al. (1998). Todos os isolados bacterianos foram cultivados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Acumedia, Lansing, Mich., EUA) a 37°C por 24 horas. Alíquotas de 1 ml das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 16000 x g por 10 min. O precipitado foi lavado com 900 µl de solução salina a 0,85%, estéril, centrifugado novamente por 10 min a 16000 x g e ressuspensão com 500 µl de solução Triton X-100 (Nuclear, Diadema, SP, Brasil) a 1%, estéril. Para a

extração do DNA, as suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5 min a 8100 x g. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo para a padronização da PCR multiplex.

#### 4.2.2 Padronização da PCR Multiplex

Para a reação em cadeia da polimerase foi testado um par de iniciador específico para o gênero *Salmonella* e um par de iniciador específico para o sorovar Enteritidis.

Inicialmente, foram utilizados o par de iniciadores INVA F (Forward) e INVA R (Reverse) (FRATAMICO, 2003), para detecção de *Salmonella spp.* e o par de iniciadores IE1 F e IE1 R (WANG; YEH, 2002), que detecta um elemento de transposição específico de *Salmonella* Enteritidis, caracterizando, portanto, um marcador genético desse sorovar. Ambos pares de iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, Calif., EUA). As seqüências dos iniciadores utilizados, bem como o tamanho das seqüências de DNA amplificadas em pares de base (pb), são mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Seqüência dos iniciadores utilizados na reação de amplificação de DNA e tamanho das seqüências de DNA amplificadas em pb (pares de base).

| <b>iniciador</b> | <b>seqüência 5'→ 3'</b>       | <b>tamanho da seqüência<br/>amplificada de DNA (pb)</b> |
|------------------|-------------------------------|---|
| INVA F           | CGG TGG TTT TAA GCG TAC TCT T | 796   |
| INVA R           | CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA   |   |
| IE1 F            | AGT GCC ATA CTT TTA ATG AC    | 316   |
| IE1 R            | ACT ATG TCG ATA CGG TGG G     |   |

As reações de amplificação foram realizadas com 5 µl da amostra com DNA, extraído conforme descrito anteriormente, adicionados a um mix (15µl) constituído de tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,9 µM do par de

iniciadores INVA (FRATAMICO, 2003), 0,4  $\mu$ M do par de iniciadores IE1 (WANG;YEH, 2002) e 0,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen). O DNA foi desnaturado a 94°C por 2 min e amplificado com 35 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (58°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min) em termociclador Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc.). A extensão final foi realizada por 7 min a 72°C.

#### 4.2.3 Análise dos Produtos de Amplificação

Após a PCR, em cada reação de amplificação foram adicionados 4  $\mu$ l de tampão de amostra [Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wis., USA) 15%; azul de bromofenol (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) 0,25%]. Alíquotas de 5  $\mu$ l dessa mistura foram analisados em gel de agarose (Laboratorio Conda, Madri, Espanha) a 1,5%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM], desenvolvida a 3 V/cm durante 1 hora e 30 minutos. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídeo (Invitrogen) 0,5  $\mu$ g/ml e a amplificação dos fragmentos de DNA foi visualizada por luz UV em transiluminador (Vilber Lourmat, Torcy, ZI, França). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação Doc-print (Vilber Lourmat).

A extração de DNA, a PCR e a eletroforese das amostras foram repetidas duas vezes em dias diferentes.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ENSAIO PCR PADRONIZADO

Todos os isolados bacterianos foram utilizados na avaliação da especificidade do ensaio PCR padronizado. O teste de especificidade foi repetido duas vezes com DNA extraído em dias diferentes.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO ENSAIO PCR PADRONIZADO EM CARÇAÇA DE FRANGO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

##### 4.4.1 Contaminação das Carçaças

Peles do peito de 10 diferentes carçaças de frango foram retiradas assepticamente e analisadas separadamente. Uma porção de 10 g de cada amostra de pele foi submetida à análise microbiológica para detecção de *Salmonella spp.* A segunda porção de 10 g das amostras de peles não contaminadas foi inoculada com *Salmonella Agona* ou *Salmonella Enteritidis* IAL 1132 para obtenção de aproximadamente 1, 10 e 50 UFC por 10 g de pele. Células viáveis foram confirmadas com o crescimento em ágar BHI (Acumedia) de alíquotas de mesmos volumes que os de contaminação.

##### 4.4.2 Análise Microbiológica das Amostras

As amostras de pele contaminadas foram colocadas em sacos plásticos estéreis com 90 ml de água peptonada alcalina (Acumedia) e homogeneizadas em “Stomacher 400” (Seward, Worthing, Inglaterra). As suspensões foram transferidas para um recipiente estéril e incubadas a 37°C por 24 horas. Alíquotas de 1,0 ml e 0,1 ml do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10ml de caldo Selenito-Cistina (SC) (HiMedia, Mumbai, Índia) e em 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (HiMedia). O caldo SC foi incubado a 37°C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Hektoen (Acumedia) e xilose lisina desoxicolato de sódio (XLD) (Acumedia) foram utilizados como meios sólidos seletivos e diferenciais e incubados a 37°C por 24 h. Colônias características de *Salmonella* foram submetidas à triagem bioquímica com utilização do citrato, motilidade, produção de indol, descarboxilação da lisina, produção de gás a partir da glicose, fermentação da lactose, produção de sulfeto de hidrogênio e hidrólise da

uréia (MACFADDIN, 1980). A confirmação do gênero *Salmonella* foi feita através da técnica de aglutinação rápida com anti-soro polivalente (Probac, São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.4.3 Extração de DNA e PCR das Amostras Artificialmente Contaminadas

Alíquotas de 1 ml do enriquecimento não seletivo foram centrifugadas a 16000 x g por 10 min. O precipitado foi lavado com 900 µl de solução salina a 0,85%, estéril, centrifugado a 16000 x g por 10 min e ressuspensão com 500 µl de solução Triton X-100 (Nuclear) a 1%, estéril. Para a extração do DNA, as suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5min a 8100 x g. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo para a PCR multiplex padronizada.

A avaliação do ensaio PCR em pele de frango artificialmente contaminada foi repetida duas vezes.

#### 4.5 ANÁLISE DE CARÇAÇA DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADA

Sessenta e seis carcaças de frango, sendo 49 compradas em supermercados e açougues e 17 em feiras livres de Londrina, PR, foram analisadas. A análise microbiológica das peles retiradas do peito das carcaças foi realizada conforme descrito anteriormente.

Os isolados de *Salmonella* obtidos das carcaças de frango foram sorotipados na FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Alíquotas de 1 ml do enriquecimento não seletivo foram submetidas à extração de DNA conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo na PCR multiplex padronizada.

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico, sob o título: “Padronização de PCR para detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *Samonella Enteritidis* em carne de frango”, redigido de acordo com as normas do periódico “Journal of Food Protection”.

## 5 ARTIGO - Padronização de PCR para detecção simultânea de *Salmonella* spp. E *Salmonella* Enteritidis em carne de frango

Daniel Santos Pinto Silva<sup>1</sup>, Elisa Yoko Hirooka<sup>1</sup> e Tereza Cristina R. M. de Oliveira<sup>1</sup>

### Resumo:

A salmonelose é a doença alimentar de origem bacteriana mais prevalente no Estado do Paraná, Brasil, e o sorovar Enteritidis foi responsável por aproximadamente 80% dos surtos ocorridos nesse Estado, entre 1999 e 2006. O objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio PCR multiplex para a detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação simultânea de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango. A PCR foi padronizada utilizando-se pares de iniciadores específicos para *Salmonella* spp. e *S. Enteritidis*, que geraram produtos de DNA amplificado de 796 pb e 316 pb de comprimento, respectivamente. A especificidade do ensaio foi de 100%. Após 24 h de enriquecimento não seletivo foi possível detectar aproximadamente 1 UFC de *Salmonella* por 10 g de pele de frango artificialmente contaminada. Das 66 amostras de carcaças de frango analisadas, adquiridas no comércio de Londrina, nove (13,0%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. A presença dessa bactéria foi confirmada pelo método tradicional de cultura e identificados os sorovares Schwarzengrund e Montevideo, respectivamente, em seis e em três amostras. Através da PCR foi detectado fragmento de DNA específico que confirmou a presença do gênero *Salmonella*, porém não do sorovar Enteritidis. A PCR multiplex padronizada apresentou sensibilidade e especificidade para detectar o gênero *Salmonella* e, simultaneamente, diferenciar o sorovar Enteritidis em carne de frango após 24 horas de análise.

**Palavras-chave:** *Salmonella* spp. *Salmonella* Enteritidis. PCR. Carcaça de frango.

### INTRODUÇÃO

A salmonelose, segundo a Organização Mundial de Saúde, é uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos devido ao número de pessoas afetadas anualmente e à conseqüente perda econômica decorrente de tratamentos médico-hospitalares e da necessidade de reprocessamento e ou destruição de alimentos contaminados (7, 26).

Os surtos de salmonelose humana ocorridos no Brasil causados por *Salmonella* Enteritidis aumentaram acentuadamente a partir da segunda metade da

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, C.P. 6001, CEP 87051- 970 - Londrina, PR, Brasil.

década de 1990, tornando-se um importante problema econômico e de saúde pública. Um estudo realizado com isolados de *Salmonella* enviados ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo mostrou que, entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de S. Enteritidis de origem humana passou de 1,2% para 64,9% (20).

No Paraná, a partir de 1995, a salmonelose passou a ser a principal doença transmitida por alimentos. Entre 1999 e 2006, 52 municípios (13,0%) dos 399 que compõe esse Estado notificaram surtos de salmonelose. O sorovar Enteritidis foi identificado em 74,8% dos isolados provenientes de pacientes e em 80,0% dos isolados de alimentos envolvidos nos surtos. Portanto, epidemiologicamente é essencial identificar o sorovar Enteritidis nas análises laboratoriais de controle de qualidade de alimentos uma vez que este sorovar tem sido responsável por aproximadamente 80% dos surtos de salmonelose humana ocorridos no Paraná (8).

Vários alimentos já foram associados a surtos de salmonelose, porém, os produtos de origem avícola têm sido as principais fontes de infecção e a predominância do sorovar Enteritidis está relacionada ao consumo de carne de frango e de ovos (25, 27).

O Brasil iniciou a sua produção intensiva de aves a partir de 1960 e, atualmente, é o segundo produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, sendo o Paraná o maior Estado produtor do Brasil. Em 2007, a produção foi de aproximadamente 10,25 milhões de toneladas, com cerca de 32% deste total exportado e o consumo per capita passou de 2,3 kg, em 1971, para 37,823 kg, em 2007, tornando-se o Brasil um dos maiores consumidores de carne de frango do mundo (21). O mercado de exportação continua crescendo e a sua influência é observada em todos os níveis da produção avícola brasileira. As barreiras sanitárias têm exigido o controle da contaminação do plantel, principalmente, por *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* Como o sorovar Enteritidis não provoca sintomas clínicos graves nas aves, o monitoramento destas bactérias é muito importante para o controle da doença humana (3).

Métodos convencionais de cultura usados para a detecção de *Salmonella* em alimentos são laboriosos e demorados. Além disso, o sorovar e o fagotipo são identificados em laboratório de referência, o que dificulta uma adequada investigação epidemiológica de surtos (24).

Métodos alternativos para detecção de *Salmonella* em alimentos têm sido padronizados, entre eles, técnicas de imunoensaio, hibridização de ácido nucléico (1, 22) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (13). A PCR tem provado ser uma técnica alternativa específica e sensível para detecção de *Salmonella*, fornecendo resultados com precisão em torno de 24 horas. Além disso, observou-se que a PCR foi a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente, podendo ser empregada como ferramenta em laboratórios de Controle de Qualidade e diagnóstico (2, 9).

Várias metodologias de detecção de *Salmonella* por PCR já foram descritas utilizando pares de iniciadores para o gene *invA* (18). Esse gene confere à *Salmonella* capacidade de invadir células e está amplamente distribuído no gênero, possivelmente, entre todos os sorovares (14). Assim, pode ser utilizado como um marcador genético para o gênero. *S. Enteritidis* possui um elemento de transposição (IE) específico que pode caracterizar um marcador genético desse sorovar (23).

Dessa forma o objetivo desse trabalho foi padronizar um ensaio de PCR multiplex para detecção de *Salmonella spp.* e identificação do sorovar *Enteritidis* em carcaças de frango.

## MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos e extração de DNA. A avaliação da especificidade do ensaio PCR padronizado neste trabalho foi realizada utilizando diferentes sorovares de *Salmonella* e diferentes espécies bacterianas. Sorovares *Typhimurium*, Typhi, Infantis, Montevideo, Agona, Dublin, Newport, dois isolados do sorovar *Enteritidis* e isolados de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram adquiridos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR. Isolados de *Salmonella* dos sorovares *Enteritidis* PT 1, *Enteritidis* PT 7, London, Albany, Corvallis, Oranienburg, Mbandaka, Saintpaul, Schwarzengrund e Anatum foram fornecidos pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba) e sorotipados e fagotipados na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, (FIOCRUZ). *Salmonella Enteritidis* IAL1132 adquirida no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, foi usada como controle positivo. Todos os isolados bacterianos foram

cultivados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Acumedia, Lansing, Mich., EUA) a 37°C por 24 h. Alíquotas de 1 ml das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 16000 x g por 10 min. O precipitado foi lavado com 900 µl de solução salina a 0,85%, estéril, centrifugado a 16000 x g por 10 min e ressuspenso com 500 µl de solução Triton X-100 (Nuclear, Diadema, SP, Brasil) a 1%, estéril. Para a extração do DNA, as suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5 min a 8100 x g. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo para a padronização da PCR multiplex. O teste de especificidade foi repetido duas vezes com DNA extraído em dias diferentes.

Padronização da PCR para detecção simultânea de *Salmonella spp.* e *S. Enteritidis*. Cada reação de amplificação continha 5 µl da amostra de DNA, extraído conforme descrito anteriormente, adicionados a um mix (15 µl) constituído de tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl) Invitrogen (Carlsbad, Calif., EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,9 µM dos iniciadores INVA F e R (4), específicos para o gênero *Salmonella*, 0,4 µM dos iniciadores IE1 F e R (23), específicos para o sorovar *Enteritidis* e 0,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen). A amplificação do DNA das amostras foi realizada utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 2 min seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (58°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min) em termociclador Peltier-Effect Cycling (MJ Research, Inc.). A extensão final foi realizada por 7 min a 72°C. As seqüências dos iniciadores utilizados, bem como o tamanho das seqüências de DNA amplificadas em pares de base (pb), são mostradas na Tabela 1. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Laboratorio Conda, Madri, Espanha) a 1,5%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM] e tampão de amostra [Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wis., USA) 15%; azul de bromofenol (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) 0,25%]. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídeo (Invitrogen) 0,5 µg/ml e a amplificação dos fragmentos de DNA, visualizada em sistema de fotodocumentação Docprint (Vilber Lourmat, Torcy, ZI, França). A extração de DNA, a PCR e a eletroforese das amostras foram repetidas duas vezes, em dias diferentes.

**Tabela 1** – Seqüência dos iniciadores utilizados na reação de amplificação de DNA e tamanho das seqüências de DNA amplificadas em pares de base (pb).

| iniciador | seqüência 5'→ 3'              | tamanho da seqüência amplificada de DNA (pb) |
|-----------|-------------------------------|--|
| INVA F    | CGG TGG TTT TAA GCG TAC TCT T | 796  |
| INVA R    | CGA ATA TGC TCC ACA AGG TTA   |  |
| IE1 F     | AGT GCC ATA CTT TTA ATG AC    | 316  |
| IE1 R     | ACT ATG TCG ATA CGG TGG G     |  |

Avaliação do ensaio PCR padronizado em carcaça de frango artificialmente contaminada. Peles do peito de 10 diferentes carcaças de frango foram retiradas e analisadas separadamente. Uma porção de 10 g de cada amostra de pele foi submetida à análise microbiológica para detecção de *Salmonella spp.* A segunda porção de 10 g das amostras de peles não contaminadas foi inoculada com *Salmonella Agona* ou *Salmonella Enteritidis* IAL 1132 para obtenção de aproximadamente 1, 10 e 50 UFC por 10 g de pele. As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis com 90 ml de água peptonada alcalina (Acumedia) e homogeneizadas em “Stomacher 400” (Seward, Worthing, Inglaterra). As suspensões foram transferidas para um recipiente estéril e incubadas a 37°C por 24 h. Alíquotas de 1,0 ml e 0,1 ml do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 ml de caldo Selenito-Cistina (SC) (HiMedia, Mumbai, Índia) e em 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (HiMedia). O caldo SC foi incubado a 37°C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Hektoen (Acumedia) e xilose lisina desoxicolato de sódio (XLD) (Acumedia) foram utilizados como meios sólidos seletivos e diferenciais e incubados a 37°C por 24 h. Colônias características de *Salmonella* foram submetidas à triagem bioquímica com crescimento em citrato de Simmons, motilidade, produção de indol, descarboxilação da lisina, produção de gás a partir da glicose, fermentação da lactose, produção de sulfeto de hidrogênio e hidrólise da uréia (10). A confirmação do gênero *Salmonella* foi feita através da técnica de aglutinação rápida com anti-soro polivalente (Probac, São Paulo, SP, Brasil). Para a PCR, alíquotas de 1 ml do enriquecimento não seletivo foram centrifugadas a 16000 x g por 10 min. O precipitado foi lavado com 900 µl de solução salina a 0,85%, estéril, centrifugado a 16000 x g por 10 min e ressuspensão

com 500 µl de solução Triton X-100 (Nuclear) a 1%, estéril. Para a extração do DNA, as suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5 min a 8100 x g. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo na PCR multiplex padronizada. A avaliação do ensaio de PCR em carcaças de frango artificialmente contaminadas foi repetida duas vezes.

Análise de carcaças de frango naturalmente contaminadas. Sessenta e seis carcaças de frango compradas no comércio de Londrina, PR, foram analisadas. A análise microbiológica das peles retiradas do peito das carcaças foi realizada conforme descrito anteriormente. Os isolados de *Salmonella* obtidos das carcaças de frango foram sorotipadas na FIOCRUZ, Rio de Janeiro (Brasil). Alíquotas de 1 ml do enriquecimento não seletivo foram submetidas à extração de DNA conforme descrito. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo na PCR multiplex padronizada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os sorovares de *Salmonella*, inclusive os isolados de *S. Enteritidis* foram identificados pela presença da amplificação do fragmento de DNA de 796 pb, obtido com o par de iniciadores INVA. Os quatro isolados de *S. Enteritidis* testados apresentaram, além desse fragmento marcador específico do gênero, o produto da amplificação do fragmento de DNA de 316 pb, obtido com a utilização do par de iniciadores IE1, específico para esse sorovar. Quando os dois pares de iniciadores foram testados com *C. freudii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *M. morganii*, *S. sonnei*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* e *E. coli* não foi possível visualizar os fragmentos de DNA de 796 e 316 pb.

Rahn et al. (17), utilizando um par de iniciadores para o gene *invA*, avaliaram 630 isolados de *Salmonella* de 100 sorovares diferentes e 142 isolados de 21 gêneros bacterianos e observaram especificidade de 99,4%. Apenas dois isolados de *S. Litchfield* e de *S. Senftenberg* não geraram o fragmento de DNA amplificado esperado. Oliveira et al (16) e Malorny et al. (11), utilizando o mesmo par de iniciadores utilizado por Rahn et al. (17), observaram especificidade de 100% na identificação dos isolados de *Salmonella spp.* testados.

Recentemente, Moganedi et al. (12) utilizaram o ensaio PCR padronizado por Rahn et al. (17) e não encontraram o fragmento de DNA amplificado

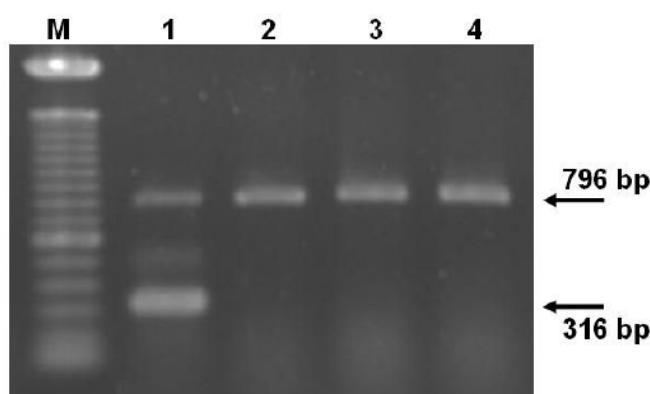
esperado em apenas dois isolados, *S. Pullorum* e *S. Arizonae*, dos 14 diferentes sorovares de *Salmonella* testados.

Fratamico e Strobaugh (5) desenvolveram o par de iniciadores INV A, que foi utilizado nesse trabalho, e obtiveram especificidade de 100% na identificação dos 42 isolados de *Salmonella* de 18 diferentes sorovares testados, inclusive *S. Senftenberg* e *S. Arizonae*.

Os resultados observados no presente trabalho são semelhantes aos encontrados por Fratamico e Strobaugh (5) e semelhantes também, aos encontrados por Wang e Yeh (23), que desenvolveram o par de iniciadores IE1 para padronizar um ensaio PCR para identificação de *S. Enteritidis*.

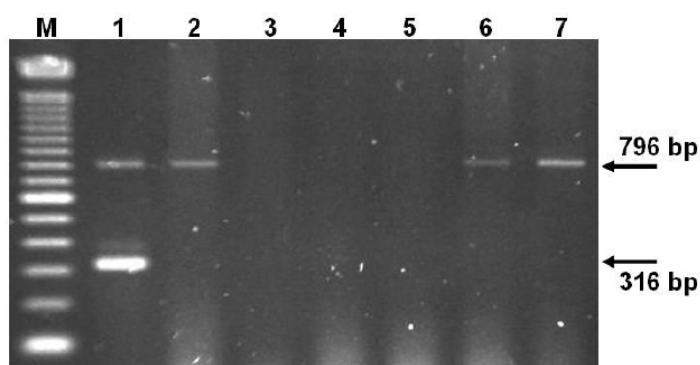
O uso do enriquecimento não seletivo antes da PCR foi apropriado para diluir substâncias inibidoras e células não-viáveis, como também, fornecer condições favoráveis para o crescimento e multiplicação de *Salmonella* a um número detectável, como observado anteriormente por outros autores (6, 15, 18, 19).

Ambos fragmentos de DNA amplificado de 796 e 316 pb foram observados em carcaças de frango artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*, após 24 horas de enriquecimento não seletivo. Das carcaças artificialmente contaminadas com *S. Agona*, foi observado apenas produto de amplificação do fragmento de DNA de 796 pb (Fig. 1). As análises microbiológicas confirmaram a presença de *S. Agona* e *S. Enteritidis* nas carcaças de frango contaminadas artificialmente com esses sorovares.



**Figura 1** – Perfil eletroforético obtido através de PCR multiplex de carcaça de frango artificialmente contaminada com *Salmonella* Agona. Produto de amplificação do controle positivo *S. Enteritidis* IAL 1132 (1), produto de amplificação dos enriquecimentos não seletivos com 1, 10 e 50 UFC de *S. Agona* por 10 g de pele (2, 3 e 4, respectivamente). M, marcador molecular DNA (100pb) (Invitrogen).

Das 66 amostras de carcaças de frango adquiridas no comércio de Londrina, PR, nove (13,0%) estavam contaminadas com *Salmonella spp.* A presença dessa bactéria patogênica foi confirmada pelo método tradicional de cultura e após sorotipagem, foram identificados os sorovares Schwarzengrund e Montevideo em seis e três amostras, respectivamente. Na análise por PCR foram detectados apenas produtos de amplificação do fragmento de DNA de 796 pb, confirmando a não presença de *S. Enteritidis* (Fig. 2).



**Figura 2** – Perfil eletroforético obtido através de PCR multiplex de carcaças de frango naturalmente contaminadas. Produto de amplificação do controle positivo *S. Enteritidis* IAL 1132 (1), produto de amplificação de uma amostra contaminada com *Salmonella* Schwarzengrund (2), duas amostras contaminadas com *Salmonella* Montevideo (6 e 7) e de três amostras não contaminadas (3, 4 e 5). M, marcador molecular DNA (100pb) (Invitrogen).

Embora o número de amostras de carcaças de frango naturalmente contaminadas analisadas tenha sido pequeno, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o ensaio PCR multiplex padronizado apresenta sensibilidade e especificidade para detectar o gênero *Salmonella* neste produto e, simultaneamente, diferenciar o sorovar Enteritidis em 24 horas de análise.

A rapidez, especificidade e sensibilidade da PCR padronizada neste trabalho vêm de encontro às necessidades dos laboratórios de Diagnóstico e de rotina de Controle de Qualidade de Alimentos que precisam ter acesso a um método rápido e confiável de detecção de *Salmonella* em alimentos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Professoras Leda Maria Koelblinger Sodré, do Departamento de Biologia Geral e Sueli Fumie Yamada Ogatta, do

Departamento de Microbiologia da UEL, pelas orientações no início do trabalho com biologia molecular. À Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues e à Eliane Moura Falavina dos Reis, do Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, pela sorotipagem dos isolados de *Salmonella*. À CAPES, pela bolsa de mestrado de Daniel. Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- Alcocer, I., T.C.R.M. Oliveira. 2003. Detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. *Ci. Tecnol. Aliment.* 23: 401–408.
- Flôres, M.L., V.P. Nascimento, I.I.T.A. Kader, L.R. Santos, A.P. Pontes, C.T.P. Salle, R.F.F. Lopes. 2001. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. *Cienc. Rural.* 31: 315–318.
- Franco, B.D.G.M., M. Landgraf. 2002. *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu, São Paulo.
- Fratamico, P.M. 2003. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of ***Salmonella spp.*** in naturally contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Mol. Cell. Probes.* 17:215–221.
- Fratamico, P.M., T.P. Strobaugh. 1998. Simultaneous detection of *Salmonella spp* and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21:92–98.
- Hassan, S.R.U., V. Verma, G.N. Qazi. 2004. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 18:333–339.
- Kaku, M., J.T.M. Peresi, A.T. Tavechio, S.A. Fernandes, A.B. Batista, I.A.Z. Castanheira, G.M.P. Garcia, K. Irino, D.S. Gelli. 1995. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saude Publica.* 29:127–131.
- Kottwitz, L.B.M. 23 February 2008. *Personal communication*. Email: [lukottwitz@yahoo.com.br].
- Li Y., A. Mustapha. 2004. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *Food Microbiol.* 21:369–375.
- MacFaddin, J.F. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. William & Wilkins, Baltimore, USA.
- Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge, R. Helmuth. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:290–296.

- Mogamedi, K.L.M., E.M.A. Goyvaerts, S.N. Venter, M.M. Sibara. 2007. Optimisation of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre cultivation step. *Water SA*. 33:195–202.
- Mullis, K.B., F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335–350.
- Olah, P.A., J.S. Sherwood, C.M. Logue. 2005. Molecular analysis of *Salmonella* isolates recovered from processed turkey carcasses. *J. Food Prot.* 68:845-849.
- Oliveira, S.D., C.R. Rodenbusch, M.C. Cé, S.L.S. Rocha, C.W. Canal. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:217–221.
- Oliveira, S.D., L.R. Santos, D.M.T. Schuch, A.B. Silva, C.T.P. Salle, C.W. Canal. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87:25–35.
- Rahn K., S.A. De Grandis, R.C. Clarke, S.A. McEwen, J.E. Galán, C. Ginocchio, R. Curtiss III,; C.L. Gyles. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6:271–279.
- Salomonsson, A.N., A. Aspán, S. Johansson, A. Heino, P. Häggblom. 2005. *Salmonella* detection by polymerase chain reaction after pre enrichment of feed samples. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.* 13:96–110.
- Sharma, V.K., S.A. Carlson. 2000. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment broth culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5472–5476.
- Tavechio, A.T.; S. Fernandes, B. C. Neves, A.M.G. Dias, K. Irino. 1996. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella Enteritidis* in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 38:315-322.
- União Brasileira de Avicultura. 2008. Últimos Números da Avicultura -Dezembro - 2007. Available at: [http://www.uba.org.br/ubanews\\_dezembro\\_07.php](http://www.uba.org.br/ubanews_dezembro_07.php). Accessed 22 April 2008.
- Wan, J.; K. King, H. Craven, C. McAuley, S.E. Tan and M.J. Coventry. 2000. Probelia PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:267–271.
- Wang, S.J., D.B. Yeh. 2002. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella Enteritidis* in foods and faecal samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 422–427.
- Whyte, P., K. McGill, J.D. Collins, E. Gormely. 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet. Microbiol.* 89:53–60.

World Health Organization. 2002. *Foodborne diseases, emerging*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>. Accessed 24 march 2008.

World Health Organization. 2005. *Drug-resistant Salmonella*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/index.html>. Accessed 24 march 2008.

World Health Organization. 2006. *Global Salm-Surv Progress Report 2000 -2005*. Available at: <http://www.who.int/salmsurv/en/>. Accessed 24 march 2008.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio PCR multiplex padronizado no presente trabalho é uma alternativa viável para diminuir o tempo de detecção de *Salmonella* em carne de frango. Será necessário avaliar se as condições de preparo das amostras e da PCR padronizadas neste trabalho são adequadas para a análise de outros alimentos. Além disso, outros trabalhos seriam interessantes de serem realizados, tais como: incluir, na diferenciação simultânea, os sorovares Newport, Derby, Infantis e Typhimurium que foram, depois de Enteritidis, os principais sorovares responsáveis por surtos de salmonelose ocorridos no Paraná, entre 1999 e 2006; testar tempos de enriquecimento não seletivo mais curtos com a finalidade de diminuir ainda mais o tempo de análise.

## REFERÊNCIAS

AHN, S.; WALT, D. R. Detection of *Salmonella spp.* using microsphere-based, fiber-optic DNA microarrays. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 5041-5047, 2005.

ALCOCER, I. R., OLIVEIRA, T. C. R. M. Detecção rápida de *Salmonella Enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401-408, 2003.

ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella spp.* e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004**. 2004. 216f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ALCOCER, I. R. et al. Discriminação de sorovares de *Salmonella spp.* isolados de carcaças de frango por REP e ERIC PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006.

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**, v. 42, n. 4, p. 1734-1738, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Virginia: AOAC, 1995. p. 55-95.

BAIRD-PARKER, A. C. Food borne illness: food borne *salmonellosis*. **The Lancet**, v. 336, n. 17, p. 1231-1235, 1990.

BEJA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, B. F. **Genética, Biotecnologia e Agricultura**. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005. 96p.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella**: a practical approach to the organism and its control in foods. Oxford: Blackwell Science, 2001. 330p.

BEUMER, R. R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F. M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella spp.*: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 363-374, 1991.

BLACKBURN, C. W. et al. Evaluation of the Vitek Immunodiagnostic Assay System (VIDAS) for the detection of *Salmonella* in foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 32-36, 1994.

BRASIL. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella spp.* em Carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União, de 10 de outubro de 2003, Seção 1, p. 9.

BRASIL. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Diário Oficial da União, de 22 de setembro de 1994.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRIGMON, R. L. et al. Detection of *Salmonella Enteritidis* in environmental samples by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 152, p. 135-142, 1992.

CHAMBERLAIN, J.S. et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141-11156, 1988.

D'AOUST, J. Y. et al. Performance Assessment of the GENE-TRAK<sup>®</sup> Colorimetric Probe Assay for the detection of foodborne *Salmonella spp.* **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 10, p. 1069-1076, 1995.

ELLINGSON, J. L. E. et al. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 51-57, 2004.

ESPIÑOZA-MEDINA, I. E. et al. PCR identification of *Salmonella*: potential contamination sources from production and postharvest handling of cantaloupes. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 6, p. 1422-1425, 2006.

FLÔRES, M.L. et al. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 315-318, 2001.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties**, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182p.

FRATAMICO, P. M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 215-221, 2003.

GALÁN, J. E.; CURTISS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 6383-6387, 1989.

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4338-4349, 1992.

GARCIA, J. G. N.; MA, S. F. Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. 429-432, 2005.

GASPARETTO, K. M. P. O. et al. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças de frango e avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 2, p. 185-199, 2001.

GOODING, C. M.; CHOUDARY, P. V. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 341-347, 1999.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HASSAN, S. R. U.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333-339, 2004.

HOORFAR, J.; BAGGENSEN, D. L.; PORTING, P. H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 7-84, 1999.

JOFRÉ, A. et al. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 109-115, 2005.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 127-131, 1995.

KAWASAKI, S. et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 551-556, 2005.

KEITH, M. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 682-685, 1997.

KONG, R. Y. C. et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. **Water Research**, v. 36, p. 2802-2812, 2002.

KOTTWITZ, L. B. M. **Informações eletrônicas** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por < terezaoliveira@yahoo.com > em 23 fev. 2008.

LEE, S.Y. et al. Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on the surface of raw shelled almonds by exposure to steam. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 591-595, 2006.

LI, Y.; MUSTAPHA, A. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. **Food Microbiology**, v. 21, p. 369-375, 2004.

LIMING, S. H.; BHAGWAT, A. A. Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 177-187, 2004.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: William & Wilkins, 1980. 527 p.

MAIJALA, R. et al. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**, v. 16, p. 669-675, 2005.

MIYAMOTO, T. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis for detection of *Salmonella spp.* in foods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 785-791, 1998.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NOVAIS, C. N.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

NATIONAL VETERINARY INSTITUTE. **Zoonoses in sweden up to and including**. 1999. Disponível em: <<http://www.sva.se/upload/pdf/Tjänster%20och%20produkter/Trycksaker/zoonosinsw e den.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2008.

OLAH, P. A.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Molecular analysis of *Salmonella* isolates recovered from processed turkey carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 845-849, 2005.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 1-9, 2000.

OLIVEIRA, S. D. et al. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 25-35, 2002.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M. W. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 105-111, 2005.

PATEL, J. R. et al. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 39-46, 2006.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 8. ed. Paris: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Pasteur Institute, 2001.

PORTER, S. B.; CURTIS III, R. Effect of *inv* mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old white leghorn chicks. **Avian Diseases**, v. 41, n.1, p. 45-47, 1997.

QVIST, S. NordVal: a Nordic system for validation of alternative microbiological methods. **Food Control**, v. 18, p. 113-117, 2007.

RYCHLÍK, I. et al. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 269-272, 1999.

SALOMONSSON, A. N. et al. *Salmonella* detection by polymerase chain reaction after pre-enrichment of feed samples. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 13, p. 96-110, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2.

SEO, K. H.; VALENTIN-BON, I. E.; BRACKETT, R. E. Detection and enumeration of *Salmonella Enteritidis* in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 639-643, 2006.

SHAW, S. J.; BLAIS, B. W.; NUNDY, D. C. Performance of the Dynabeads anti-*Salmonella* system in the detection of *Salmonella* species in foods, animal feeds, and environmental samples. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1507-1510, 1998.

SU, L. H.; CHIU, C. H. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

SWANENBURG, M. et al. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 141-144, 1998.

TAUNAY, A.E. et al. The role of public health laboratory in the problem of *salmonellosis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 119-126, 1996.

TAVECHIO, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 315-322, 1996.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; FERNANDES, S. A. "Multiplex PCR" Identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i: in São Paulo State, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 115-117, 2004.

TUNUNG, R. et al. Characterization of *Salmonella enterica* Isolated From Street Food and Clinical Samples in Malaysia. **ASEAN Food Journal**, v.14, n. 3, p. 161-173, 2007.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Últimos Números da Avicultura**:dezembro 2007. Disponível em: [http://www.uba.org.br/ubanews\\_dezembro\\_07.php](http://www.uba.org.br/ubanews_dezembro_07.php). Acesso em: 22 abr. 2008.

USDA-FSIS -US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Protecting the Public From Foodborne Illness: **The Food Safety and Inspection Service**. Washington, DC: US Department of Agriculture; 2001. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/Frame/FrameRedirect.asp?main=http://www.fsis.usda.gov/OA/background/fsisgeneral.htm>.> Acesso em: 12 mar. 2008.

UYTTENDAELE, M. R. et al. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 1-8, 1998.

VANTARAKIS, A. et al. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 105-109, 2000.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WAN, J. et al. Probabilia PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 267-271, 2000.

WANG, S. J.; YEH, D. B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella Enteritidis* in foods and faecal samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 422-427, 2002.

WEGENER, H. C. et al. *Salmonella* control programs in denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, 774-780, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases, emerging**.2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistant Salmonella**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/index.html>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global salm-surv progress report 2000-2005**. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/salmsurv/en/>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

WHYTE, P. et al. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 53-60, 2002.

WILLIAMS, J. G. K. et al. Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZHAO, S. et al. Characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from imported foods. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 500-507, 2006.