



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA*
SPP. E DIFERENCIAÇÃO DE *S. ENTERITIDIS* E *S.*
TYPHIMURIUM EM CARNE DE FRANGO**

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA*
SPP. E DIFERENCIAÇÃO DE *S. ENTERITIDIS* E *S.*
TYPHIMURIUM EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S127m Saeki, Erika Kushikawa.
Multiplex PCR (PCRm) para detecção e diferenciação de *Salmonella*
spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango / Erika
Kushikawa Saeki. – Londrina, 2011.
70 f. : 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, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Microbiologia – Teses. 2. Salmonelose – Teses. 3.
Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Frango de corte – Análise –
Teses. 5. Alimentos – Contaminação – 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

ERIKA KUSHIKAWA SAEKI

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E
DIFERENCIAÇÃO DE *S. ENTERITIDIS* E *S. TYPHIMURIUM* EM
CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de
Oliveira
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Marciane Magnani
UFPB – João Pessoa – PB

Londrina, 15 de dezembro de 2011.

DEDICO

Dedico esta conquista,

À minha mae Olga

Pelo amor, incentivo, amizade, orações, apoio em todas as fases da minha vida.

À minha avo Toshiko (in memoriam)

Que sempre acreditou nos meus sonhos e me ensinou que na vida tudo e poss vel.

Saudades eternas...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Tereza Cristina R. M. de Oliveira** pela excelente orientação, paciência, compreensão e por compartilhar tamanha experiência. Muito Obrigada pela confiança e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade, competência e pelos conhecimentos compartilhados.

À Profa Dra. **Elisa Yoko Hirooka** pela amizade e pelas sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Dra. **Marciane Magnani** pela disponibilidade e aceite para participação da banca da defesa.

À Profa. Dra. **Sueli Fumie Yamada Ogatta** pelas preciosas sugestões no exame de qualificação e pelo aceite para participação da banca de defesa.

À pesquisadora **Ana Maria Iba Kanashiro** do Instituto Biológico, CAPTAA, Descalvado, SP; pela concessão das cepas de *Salmonella* Kentucky para o desenvolvimento deste trabalho.

À Msc. **Sônia Maria de Souza Santos Farah** do setor de Bacteriologia Geral do Laboratório Central do Estado, São José dos Pinhais, PR; pela doação de diversos sorovares de *Salmonella* spp.

À amiga **Juliane Alves** pelo convívio no laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pela amizade. À **Natália Harumi Niguma** pela ajuda no laboratório, pela amizade e pelo convívio. À amiga **Raissa Curti Bonfanti** pela valiosa ajuda na parte experimental, pela amizade e pela companhia no laboratório. À **Thalyta Marina Benetti** pela convivência no primeiro ano do Mestrado. Obrigada pela amizade e carinho.

Às amigas **Maria Rita Alaniz Porto** e **Marianne Ayumi Shirai** pela amizade, pelo convívio, pelo incentivo, sempre dispostas a ouvir meus desabafos.

Às amigas da Pós-graduação em Ciência de Alimentos, **Angélica Ishikawa**, **Danielle Honorato**, **Marcela Kobayashi**, **Marines Corso** e **Tahis Baú** pela amizade, carinho, e que fizeram de Londrina um ótimo lugar pra se viver.

À amiga-irmã **Suzy Sayuri Kurokawa** por todos os momentos compartilhados. Você foi essencial para a minha adaptação em Londrina. Su, sempre serei grata por tudo, principalmente, pela amizade, carinho, respeito e conselhos. Enfim, a nossa amizade é e sempre será muito especial.

As amigas "machadenses" **Simone Moro Rocha, Tháira Gaspar Mendes, Mayara Galante Negri, Adriana Nakada e Denise Katsutani** por acreditarem em mim, pelo carinho em todas as horas, por todos os momentos. Obrigada pela eterna amizade.

Ao Prof. Dr. **Leopoldo Sussumu Matsumoto**, a quem devo meu ingresso na área da Microbiologia e pela primeira chance de realizar pesquisa como bolsista de iniciação científica. Obrigada pela amizade e respeito.

A minha mãe, **Olga Kushikawa Saeki**, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e educação. Sem palavras para explicar o quanto é importante na minha vida pessoal e profissional. Você é a minha maior inspiração de persistência e dedicação.

Ao meu pai **Hiroshi Saeki** (*in memoriam*) e avós **Nobuyuki Kushikawa** (*in memoriam*) e **Toshiko Kushikawa** (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, amor e carinho. Saudades...

Ao **Renan Luiz Barros de Souza** pelo amor, compreensão, companheirismo, paciência e incentivo, por me dar forças para superar todos os momentos difíceis que passamos juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

E principalmente a **DEUS** pela saúde, conhecimento, proteção e por tudo que conquistei. Por me direcionar nos momentos de alegria, e principalmente nos momentos de aflição e tristeza. Obrigada por tudo dar tão certo na minha vida!

Os sonhos trazem saúde para emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de raro valor. Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades."

(Augusto Gury)

SAEKI, Erika Kushikawa. **PCR multiplex para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango.** 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

Salmonella entérica subespécie entérica sorovares Enteritidis e Typhimurium são importantes agentes causadores de infecções alimentares. Métodos de detecção simultânea destes sorovares podem contribuir para a adoção de medidas de prevenção destas doenças. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção individual ou simultânea (PCRm) dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em alimentos já foram padronizados, no entanto, a maioria emprega o gene *fliC* como alvo para detecção do sorovar Typhimurium. A especificidade deste gene é questionável, pois também já foi descrito para *S. Kentucky*. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um novo ensaio PCR multiplex (PCRm) para a detecção e diferenciação simultânea de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango. O gene STM4492, que foi utilizado para diferenciar *S. Typhimurium*, nunca havia sido utilizado em ensaio multiplex para diferenciação desses sorovares. Os ensaios de PCRm revelaram elevada especificidade para *S. Typhimurium* com capacidade de diferenciá-lo dos 22 sorovares de *Salmonella* testados, incluindo *S. Kentucky*. Os pares de oligonucleotídeos Styinva-JHO-2 (gene *invA*) e ENT (gene *sdf*) empregados no ensaio para detecção de *Salmonella* spp. e *S. Enteritidis* mostraram-se também específicos. A sensibilidade do ensaio foi de 100% e a especificidade de 94,8%. O ensaio foi capaz de detectar 1 a 10 UFC/mL de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* após 24 horas de enriquecimento não seletivo e extração do DNA com TZ e fervura sem purificação. A extração do DNA com TZ e fervura é adequada e, devido a sua simplicidade, pode ser utilizada na rotina laboratorial. O ensaio mPCR desenvolvido mostrou ser viável e apresentar sensibilidade satisfatória para a detecção de *Salmonella* spp. e a diferenciação dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em carne de frango. Dada a importância dos surtos de salmonelose, o ensaio mPCR padronizado pode ser utilizado como ferramenta de triagem rápida em laboratórios de análise de alimentos e como técnica alternativa para a identificação específica dos sorovares Enteritidis e Typhimurium a partir de cepas isoladas pelo método convencional.

Palavras-chave: Detecção rápida. Reação em cadeia da polimerase. Salmonelose. Solução de lise TZ.

SAEKI, Erika Kushikawa. **Multiplex PCR for detection of *Salmonella* spp. and differentiation of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in chicken meat.** 2011. 70p. Dissertation (Master in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium are important causes of foodborne illness. Methods for simultaneous detection of these serovars may contribute for the adoption of measures to prevent these diseases. The polymerase chain reaction (PCR) to detect individually or simultaneously the serovars Enteritidis and Typhimurium in foods have been standardized, however, the majority of assays employs the *fliC* gene as a target for detection of serovar Typhimurium. The specificity of that gene is questionable, as it has also been described for *S. Kentucky*. In this context, the aim of this study was to develop a new multiplex PCR assay (mPCR) for the simultaneous detection and differentiation of *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in chicken meat. The gene STM4492, that was used to differentiate *S. Typhimurium*, has never been used in multiplex assay for differentiation of those serovars. The mPCR assays showed high specificity and differentiated *S. Typhimurium* from 22 *Salmonella* serovars tested, including *S. Kentucky*. The pairs of oligonucleotides Styinva-JHO-2 (gene *InvA*) and ENT (*sdf* gene), used in the assay for detection of *Salmonella* spp. and *S. Enteritidis*, were also specific. The assay sensitivity was 100% and specificity of 94.8%. The mPCR can detect 1 to 10 CFU / mL of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* after 24 hours of non-selective enrichment and DNA extraction with TZ and boiling, without purification. The DNA extraction with TZ and boiling is adequate, and because of its simplicity, can be used in routine laboratory. The developed mPCR assay was adequate and showed satisfactory sensitivity for detection of *Salmonella* spp. and differentiation of serovars Typhimurium and Enteritidis in chicken meat. Given the importance of *Salmonella* outbreaks, the mPCR can be used as a screening tool for a rapid laboratory analysis of food and as an alternative technique for the identification of strains of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* isolated from the conventional method.

Keywords: Rapid detection. Polymerase chain reaction. Salmonellosis. TZ lysing solution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Análise por PCRm de amostras de carne de frango. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028; 4) amostra naturalmente contaminada com *S. Typhimurium*; 5-6) amostras naturalmente contaminadas com *Salmonella* spp.; 4.7) amostra negativa para *Salmonella* spp.....45
- Figura 2** – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura em amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-10) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Enteritidis*.....48
- Figura 3** – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura em amostras artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^0 UFC/mL de *S. Typhimurium*.....49
- Figura 4** – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura seguida de purificação em amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Enteritidis*.....49
- Figura 5** – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura seguida de purificação em amostras artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Typhimurium*49

Figura 6 – Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. 1.1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1.2) controle negativo; 1.3) controle positivo para o gênero *Salmonella*; 1.4) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076; 1.5) controle positivo de *S. Typhimurium* ATCC 14028; 1.6) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 1.7) cepa de *S. Enteritidis*; 1.8) cepa de *S. Typhimurium*; 1.9) *S. Bredeney* e 1.10) *S. Senftenberg*69

Figura 7 – Limite de detecção da PCRm com o DNA extraído por fervura para identificação de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A.1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); A.2) controle negativo; A.3-A.6) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre 10^8 a 10^5 UFC/mL de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 1402870

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de sorovares em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i> spp.....	21
Tabela 2 – Genes alvos utilizados em Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação ou detecção de <i>Salmonella</i> spp	30
Tabela 3 – Genes alvos utilizados em Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação ou detecção do sorovar Enteritidis e Typhimurium.....	31
Tabela 4 – Isolados bacterianos utilizados neste estudo e suas procedências.....	33
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação PCRm para detecção de <i>Salmonella</i> spp, S. Enteritidis e S. Typhimurium	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
ABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	caldo infusão de cérebro e coração
BS	ágar Bismuto Sulfito
CA	Estado da Califórnia
CAPTAA	Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola
CCAMP	sub-coleção de <i>Campylobacter</i>
CCBS	Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Código de Endereçamento Postal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desorribonucleosídeos trifosfatados
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESFA	<i>European Food Safety Authority</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	grama
G	força G
H	horas
H	antígenos flagelares
HE	ágar Hecktoen
HCl	ácido clorídrico
IB	Instituto Biológico
ICMSF	Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas em Alimentos
IP	Ilhas de Patogenicidade

KCl	cloreto de potássio
Km	quilômetros
LACEN	Laboratório Central do Estado
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
PCRm	Reação em Cadeia da Polimerase multiplex
n	número de amostras
NJ	Estado de New Jersey
NN	número de resultados negativos na metodologia de referência
NNS	número de resultados negativos simultaneamente na metodologia de referência e na testada
NP	número de resultados positivos na metodologia de referência
NPS	número de resultados positivos simultaneamente na metodologia de referência e na testada
O	antígenos Somáticos
pb	pares de bases
PCC	Pontos Críticos de Controle
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese de campo pulsado)
pH	potencial hidrogeniônico
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
PR	Estado do Paraná
PRP	Programa de Redução de Patógenos
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (Análise Randômica do DNA Polimórfico)
RFLP-PCR	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição)
RJ	Estado do Rio de Janeiro

RS	Estado do Rio Grande do Sul
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR (Reação da Transcriptase Reversa)
RV	Rappaport-Vassiliadis
S	segundos
SES	Secretaria do Estado da Saúde
SC	caldo Selenito-Cistina
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SP	Estado de São Paulo
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Islands</i> (Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>)
SPI-1	Ilha de patogenicidade 1 de <i>Salmonella</i> spp.
SPI-2	Ilha de patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i> spp.
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	temperatura ambiente
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
TT	caldo Tetrionato
TZ	Solução de lise (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0)
U	unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	unidades formadoras de colônias
UFC/mL	unidades formadoras de colônias por mililitro
UHT	<i>Ultra-high temperature</i> (Ultra alta temperatura)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos)
UV	ultravioleta
V	volt
Vi	Antígenos Capsulares
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
XLD	ágar Desoxicolato-lisina-xilose
µL	microlitro
µL/mL	microlitro por mililitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS EPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	SALMONELLA SPP., SALMONELOSE E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	20
3.2	CONTAMINAÇÃO DE CARNE DE FRANGO POR SALMONELLA SPP.....	24
3.3	MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA SPP.....	26
3.4	PCR PARA SALMONELLA SPP	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	33
4.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	34
4.2.1	Extração do DNA.....	34
4.2.2	Purificação de DNA	34
4.2.3	PCRm para Detecção de Salmonella spp., S. Enteritidis e S. Typhimurium	34
4.2.4	Análise dos Produtos de Amplificação.....	36
4.2.5	Análise da Especificidade dos Oligonucleotídeos Iniciadores	36
4.2.6	Avaliação do Limite de Detecção do Ensaio PCRm	36
4.3	ANÁLISE POR PCRm DA CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA	37
4.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E PCRm DE CARNE DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADAS	37
4.4.1	Pesquisa de Salmonella spp. pelo Método Microbiológico Convencional	37
4.4.2	Pesquisa de Salmonella spp. e Sorovares Enteritidis e Typhimurium por PCRm.....	39
4.5	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCRm PADRONIZADA	39

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	NOVA PCRm PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP. E DIFERENCIAÇÃO SIMULTÂNEA DOS SOROVARES ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM EM CARNE DE FRANGO	40
5.2	INFLUÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO POR FERVURA EM ENSAIOS DE PCRm PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP	48
5.3	ANÁLISE DE CARNES DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADAS PELA TÉCNICA CONVENCIONAL.....	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	APÊNDICES	68
	APÊNDICE A – Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCRm	69
	APÊNDICE B – Limite de detecção do ensaio PCRm com o DNA extraído pelo método de fervura	70

1 INTRODUÇÃO

As doenças veiculadas por água e alimentos (DVA) constituem um importante problema de saúde pública (LEITE; WAISSMANN, 2006), sendo responsáveis pela maior parte dos surtos de gastroenterite (SILVA et al., 2004). Estratégias que permitam o seu controle e a oferta de produtos inócuos tem sido uma preocupação constante tanto dos órgãos governamentais quanto da indústria alimentícia (TESSARI et al., 2008).

A alteração do cenário econômico aliada, as mudanças nos hábitos alimentares e aumento da oferta e utilização de alimentos industrializados resultaram em uma maior exposição da população a contaminantes microbianos (CVE/CCD-SES, 2005). Dentre estes, *Salmonella* spp. é um dos patógenos responsáveis por doenças veiculadas por alimentos, sendo agente envolvido em surtos registrados em diversos países (CAPITA; ALONSO-CALLEJA; PRIETO, 2007; FEARNLEY et al., 2008; KOTTWITZ et al., 2010). Neste contexto, o número de casos e surtos de salmonelose é subestimado, porque a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalização e sem o isolamento do microorganismo no alimento incriminado (SHINOHARA et al., 2008).

Salmonella spp. são responsáveis por uma variedade de doenças aviárias, como a pulorose por *Salmonella Pullorum*, tifo aviário por *Salmonella Gallinarum* e infecções paratíficas causadas por sorovares não adaptados as aves (RIBEIRO et al., 2009). As aves infectadas por *Salmonella* paratíficas podem desenvolver a doença clinicamente ou de forma assintomática, transportando esses agentes e tornando-se fonte em potencial da bactéria para seres humanos (TESSARI et al., 2008).

Dentre as salmonelas paratíficas, *Salmonella enterica* subsespécie *enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium são os principais agentes causadores de infecções alimentares em humanos (O'REGAN et al., 2008; LEE et al., 2009). Até meados da década de 90, *Salmonella* Enteritidis era isolada no Brasil de humanos e de animais com frequência considerada baixa. No final dos anos 90, houve um aumento significativo na prevalência deste sorovar isolado de infecções em humanos, ultrapassando *Salmonella* Typhimurium que, até então, ocupava o primeiro lugar (CASTILLA, 2003).

Desde 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, adota normas para detectar precocemente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em plantéis avícolas comerciais, mediante a realização de vigilância com testes laboratoriais de rotina (BRASIL, 1994).

Bactérias do gênero *Salmonella* podem ser isoladas e identificadas em laboratórios clínicos utilizando técnicas microbiológicas convencionais, levando vários dias para completar o procedimento. Após a identificação com testes bioquímicos e sorológicos, é necessária a diferenciação do sorovar pela sorotipagem (TOZETTO, 2006; MARTINS, 2010).

A PCR multiplex (PCRm), que é uma variação da PCR convencional, pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, sequências alvo de diferentes microorganismos patogênicos em uma única reação, com grande potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (GANDRA et al., 2008). Diversos ensaios PCRm para detecção individual ou simultânea dos sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* em alimentos já foram padronizados (SOUMET et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; LIM et al., 2003; MALKAWI; GHARAIBEH, 2004; ZAHRAEI-SALEHI et al., 2007; O'REGAN et al., 2008; NASHWA; MAHMOUD; SAMI, 2009; LEE et al., 2009; DILMAGHANI et al., 2011; PUI et al., 2011; DIANA; PUI; SON et al., 2012). Vários desses ensaios, no entanto, empregam o gene *fliC* como alvo para detecção do sorovar *Typhimurium*, que também está presente no sorovar *Kentucky* (O'REGAN et al., 2008; HASSANEIN et al., 2011).

Diante da importância da detecção e diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* na cadeia de produção de aves, bem como para o diagnóstico de salmonelose humana, no presente estudo foi desenvolvida uma nova proposta de PCR multiplex (PCRm) para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação simultânea desses sorovares em carne de frango.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio PCRm para detecção do gênero *Salmonella* e diferenciação simultânea dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em carne de frango.

2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

Definir os oligonucleotídeos iniciadores capazes de promover a diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*;

Definir as condições da PCRm que permitam o uso dos oligonucleotídeos iniciadores escolhidos simultaneamente em ensaios com culturas puras;

Determinar a sensibilidade e a especificidade da PCRm padronizada.

Avaliar o ensaio PCRm padronizado com amostras de carne de frango contaminadas artificialmente e naturalmente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SALMONELLA SPP., SALMONELOSE E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

As bactérias do gênero *Salmonella*, família Enterobacteriaceae são bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, redutores de nitrato a nitrito, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás, oxidase negativa e geralmente móveis por flagelos peritríquios (exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*). Bactérias deste gênero caracterizam-se por não hidrolisar uréia, e por serem capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono, além de fermentar manitol, descarboxilar a lisina. Ainda, grande parte dos sorovares de *Salmonella* descarboxilam ornitina (CASTRO, 2000; FREITAS, 2008; MALDONADO, 2008). Outra característica importante das bactérias deste gênero é que podem sobreviver a dessecação e ao congelamento por vários anos, desenvolvendo-se em pH ótimo próximo de 7,0 e temperatura de 35-37 °C (BESSA, 2006).

O gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. bongori* e *S. enterica*, dividida em seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (OLIVEIRA, 2006; SU; CHIU, 2007). Em 2004, foi identificada *Salmonella subterranea* isolada na região de Oak Ridge, EUA (SU; CHIU, 2007). Conforme a sequência de DNA ribossomal, essa bactéria apresentou 96,4% de similaridade com *Salmonella bongori* e por isso, ainda não há um consenso se é uma nova espécie (SHELOBOLINA et al., 2004).

As subespécies de *S. enterica* estão classificadas em sorovares, determinados de acordo com a variabilidade dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares de virulência (Vi), presentes na superfície bacteriana (GALDINO, 2010). Do ponto de vista ortográfico, os sorovares devem ser nominados com a primeira letra maiúscula, a fim de diferenciá-los de espécie e não serem grafados em itálico; *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis pode ser referenciada ou citada como *Salmonella* sorovar Enteritidis ou *Salmonella* Enteritidis (DUNKLEY et al., 2009). Até o momento, foram identificados mais de 2600 sorovares, a maioria pertencente à espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Tabela 1) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Tabela 1 – Número de sorovares em cada espécie e subespécie de *Salmonella* spp.

<i>Salmonella enterica</i>	2.587
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.547
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	513
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	100
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	341
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtanae</i>	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	23
Total (gênero <i>Salmonella</i>)	2.610

Fonte: Guibourdenche et al. (2010).

Espécies de *Salmonella* são patógenos intracelulares que podem causar diferentes manifestações de doença, genericamente denominada salmonelose e com distribuição cosmopolita (CASTILLA, 2003; LOUREIRO et al., 2010).

A susceptibilidade à salmonelose difere de pessoa a pessoa, sendo mais severa em crianças e idosos. A maioria das infecções são gastroenterites que ocorrem sem a necessidade de hospitalizações. Geralmente, o período de incubação 6 a 72 horas (h), com média de 12 a 36 h e duração de 1 a 4 dias. (CHEN et al., 2010). A gastroenterite por *Salmonella* sp. é caracterizada por dor abdominal, náuseas, vômitos e às vezes febre, sendo sintomas normalmente leves e as infecções autolimitadas (MALORNY et al., 2009; EFSA, 2011).

Embora todos os sorovares de *Salmonella* sejam considerados patógenos em potencial, aproximadamente 200 são responsáveis por infecção em seres humanos e animais. Poucos sorovares são adaptados a determinados hospedeiros causando doenças específicas. Os sorovares estritamente adaptados ao homem são *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Sendai*, responsáveis pelas febres entéricas, como a febre tifóide. *S. Dublin* causa doença em bovinos, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves. Outros sorovares denominados de ubiqüitários infectam tanto o homem como os animais, e são referidos comumente como não tifóides causando principalmente gastroenterites. Dentre estes temos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* descritos como os agentes mais importantes da salmonelose em humanos em vários países (FERNANDES et al., 2006; DAY; BASAVANNA; SHARMA, 2009; LEE et al., 2009).

Historicamente, *S. Typhimurium* foi o agente mais comum de doenças de origem alimentar humana, porém nas últimas décadas, os surtos por *S.*

Enteritidis tornaram-se mais comuns (FREITAS NETO et al., 2010). No Brasil, *S. Enteritidis* foi detectada pela primeira vez em 1989, de aves que apresentavam sintomas clínicos e mortalidade por salmonelose (FERREIRA; ITO; BENEZ, 1990 apud OLIVEIRA; SILVA, 2000). Acredita-se que sua ocorrência iniciou-se a partir do intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa, o que pode ter facilitado sua disseminação a partir do ano de 1993 (PERESI et al., 1998).

A emergência de *S. Enteritidis* pode ser associada aos prejuízos causados à avicultura pelos sorovares Pullorum e Gallinarum que motivaram iniciativas de controle e erradicação. Ambos são responsáveis pela queda na produtividade do plantel avícola e implicam na maioria das vezes na eliminação dos lotes infectados. O sorovar Enteritidis por apresentar uma maior adaptação às aves teria ocupado o nicho deixado pelos sorovares Pullorum e Gallinarum (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997; ALCOCER, 2004). Além disso, o sorovar Enteritidis demonstra grande afinidade por órgãos reprodutivos de poedeiras, o que pode ter facilitado sua colonização (VAZ, 2007).

O principal reservatório de *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais domésticos ou selvagens e humanos. Infecções em humanos são associadas principalmente com alimentos de origem animal, como carne bovina, suína, frango e ovos (YAN et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, muitos casos de surtos de DTA não são reportados e as dimensões do problema são desconhecidas (WHO, 2007). Aproximadamente 40 mil casos de salmoneloses são reportados a cada ano nos Estados Unidos e os sorovares mais comumente encontrados nas infecções humanas são Enteritidis e Typhimurium. No período de 2006 a 2011, os alimentos contaminados foram identificados em 28 surtos causados por *Salmonella* spp. Os surtos com os sorovares Enteritidis e Typhimurium estavam relacionados a alimentos, tais como, tomates, brotos de alfafa, manteiga de amendoim e ovos (CDC, 2011). Na União Européia, mais de 100.000 casos salmonelose humana são reportados por ano. E somente em 2009, foram confirmados 108.614 casos de salmoneloses (EFSA, 2011).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos é pouco conhecido no Brasil. Apenas poucos estados dispõem de Programas de Vigilância e levantamento de dados epidemiológicos sobre estes surtos (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). Segundo os dados da Secretaria da Vigilância

Sanitária do Ministério da Saúde, entre 2000 e 2011, *Salmonella* spp. foi responsável por 42,3% dos surtos que ocorreram no Brasil, dos quais foi possível a identificação do microorganismo envolvido (SVS, 2011). Estes números, provavelmente, não refletem a realidade no Brasil, visto que muitos casos não são notificados.

Vários trabalhos foram publicados nos últimos cinquenta anos que mostram uma mudança na etiologia da salmonelose ao longo dos anos. Entre 1962 e 1971, no Rio de Janeiro, foram analisadas 164 cepas de *Salmonella* spp. com prevalência dos sorovares Typhimurium (18,9%) e Newport (10,3%). Neste período, *S. Enteritidis* foi identificada em 1,8% das cepas (HOFER, 1974).

No estado de Pernambuco, entre 1978 e 1980, foram caracterizados 63 sorovares dentre 1.387 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de coproculturas de adultos e crianças com sintomas gastrintestinais. Quatro sorovares predominaram: Typhimurium (43,2%), Saintpaul (14,0%), Poona (11,7%) e Derby (11,4%). Os resultados evidenciaram um aumento no isolamento do sorovar Typhimurium e uma elevada colonização nas áreas hospitalares, associada à múltipla resistência aos antibióticos (LEAL et al., 1987).

Nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil, entre 1982 a 1991, dentre 25 casos de salmonelose confirmadas pelo método laboratorial, o sorovar mais prevalente foi Typhimurium presente em 13 casos (52,0%). Produtos avícolas, tais como, maionese caseira a base de ovos, foram os alimentos mais associados a maioria dos surtos (HOFER; REIS, 1994).

Taunay et al. (1996) avaliaram a prevalência de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. no período de 40 anos (1950-1990) no estado de São Paulo. Entre 1950 a 1966, não houve predomínio evidente de nenhum sorovar; entretanto, a partir de 1968 até 1976, *S. Typhimurium* passou a ser predominante representado 77,7% dos sorovares isolados de fontes humanas e 24,5% de fontes não humanas. A partir de 1983 a 1990 este sorovar foi encontrado em 36,0% de fontes humanas e nenhuma amostra de fontes não humanas.

Tavechio et al. (1996) caracterizaram 81 sorovares de origem humana no estado de São Paulo, entre 1991 a 1995, e relataram que *S. Enteritidis* passou de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% entre as amostras não-humanas (produtos avícolas e amostras do meio ambiente), com considerável aumento a partir de 1993.

A partir de 1993, surtos de DVA causados pelo sorovar Enteritidis passou a ser o de maior prevalência em muitos estados brasileiros. No noroeste do estado de São Paulo, um surto de salmonelose por *S. Enteritidis* envolvendo 211 crianças em idade escolar foi associado à maionese preparada com ovos crus e batata cozida (KAKU et al., 1995). Entre 1993 a 1997, 906 pessoas foram acometidas por 23 surtos de salmonelose na região Noroeste do Estado de São Paulo, e o maior número de surtos ocorreu na cidade de São José do Rio Preto. *Salmonella* Enteritidis Fagotipo 4 foi isolado de 80,5% das coproculturas e 95,7% dos surtos foi veiculado por alimentos contendo ovos crus ou semicrus (PERESI et al., 1998).

Em um estudo epidemiológico realizado no estado do Mato Grosso do Sul, entre 1998 e 2001, dos 63 surtos de origem alimentar identificados, trinta e nove (62%) foram confirmados laboratorialmente. Dentre estes, 14 surtos foram confirmados como salmonelose com predominância do sorovar Enteritidis (CÂMARA, 2002).

No estado do Paraná, os dados epidemiológicos mostram que entre 1999 a 2008, ocorreram 286 surtos de salmonelose envolvendo 5.641 pessoas, das quais 2.027 (35,9%) manifestaram sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. O sorovar prevalente foi Enteritidis, correspondendo 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos (KOTTWITZ et al., 2010).

A baixa disponibilidade, no Brasil, de informações oficiais sobre os sorovares e alimentos envolvidos nos surtos de salmonelose reforça a importância da vigilância epidemiológica na coleta de dados, para que seja conhecida a tendência da salmonelose nos diferentes estados do país

3.2 CONTAMINAÇÃO DE CARNE DE FRANGO POR SALMONELLA SPP.

O comércio internacional de carne de frangos e derivados foi influenciado negativamente a partir do ano de 2003, principalmente, pela ocorrência da Influenza Aviária (LOPES et al., 2007). Entretanto, a avicultura vem apresentando crescimento anual. Atualmente, de acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2011), o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango e o principal exportador de carne de frango. A produção

em 2010 foi de aproximadamente 12,3 milhões de toneladas de carne de frango, da qual 31,0% foram exportadas.

O crescimento da indústria avícola proporcionou uma fonte de proteína rapidamente disponível e de custo reduzido para a população, porém, houve também o aumento na taxa de infecção das aves e a contaminação das carcaças (TESSARI et al., 2008). A contaminação das carcaças de frango por *Salmonella* spp. pode ocorrer pela presença deste micro-organismo no ambiente de criação das aves e pela disseminação durante o abate (ALMEIDA; SILVA; ALMEIDA, 1993; UYTENDAELE et al., 1998). A manipulação inadequada das carcaças e a contaminação cruzada nas cozinhas domiciliares e industriais podem contribuir para a ocorrência da salmonelose humana (REZENDE et al., 2005).

No Brasil, muitos estudos de ocorrência de *Salmonella* spp. em produtos de origem avícola, indicam uma acentuada diminuição no isolamento dessa bactéria nesses produtos. Em 1996, 45 cortes de frango foram analisados (peito, asas e coxas) no comércio de Jabotibacal, SP, e os resultados mostraram que 35,0% estavam contaminados com dez sorovares de *Salmonella* spp., e o sorovar Enteritidis foi o mais prevalente (COSTA et al., 1996).

Posteriormente, Carvalho; Cortez (2005) observaram que entre 1998 e 2002, a contaminação por *Salmonella* spp. foi menor em cortes e derivados de carne de frango para a região noroeste de São Paulo. Do total de amostras analisadas, *Salmonella* spp. foi isolada de 3,3% amostras de carcaças de frango; 25,0% amostras de carne mecanicamente separada; 16,0% amostras de linguiças de frango; 30,0% amostras de peito e em 13,3% de amostras de coxas e sobre-coxas.

Em Pelotas, RS, entre 1997 e 1998, a percentagem de contaminação por *Salmonella* spp. de 124 amostras de carcaças de frango analisadas foi de 10,5% (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001). Percentagem semelhante foi encontrada em 2006 por Moreira et al. (2008a), ao analisarem 363 carcaças de frango, provenientes de abatedouros inspecionados pelo serviço de fiscalização federal no estado de Goiás, das quais 14,3% estavam contaminadas por *Salmonella* spp.

Já, em 2007, na região de Londrina, Silva et al. (2011) relataram que dentre 66 amostras de carne de frango analisadas, 13,0% (n=9) estavam contaminadas por *Salmonella* spp.

Percentagens ainda menores de contaminação com *Salmonella* spp. foram reportadas, principalmente, a partir de 2007. Tessari et al. (2008) analisaram 116 carcaças de frango congeladas, obtidas de abatedouros do estado de São Paulo, e somente 2,5% (3 amostras) estavam contaminadas com *Salmonella* spp., e uma delas com *S. Enteritidis*. Em 2010, 4,0% (n=2) das 50 amostras de carne de frango resfriadas adquiridas no comércio de Londrina, PR, foram positivas para *Salmonella* spp. (ALVES, 2010). Entre 2009 e 2010, das 5.845 amostras de carne de frango provenientes de diferentes regiões do Paraná, 242 (4,1%), estavam contaminados com *Salmonella* spp. (FRAUSTO, 2011).

Em 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu o Programa de Redução de Patógenos com o objetivo de realizar um monitoramento constante do nível de contaminação por *Salmonella* spp. em estabelecimentos de abate de aves. Esse plano foi estabelecido por meio da Instrução Normativa n°. 70 (BRASIL, 2003a), que confere um controle minucioso sobre o processo de abate e atende as exigências de segurança do alimento baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) foi estabelecido em 1995 para o controle de *Salmonella* spp. em aves no Brasil. Este programa define medidas de monitoramento das salmoneloses em estabelecimentos avícolas. Para tanto, um núcleo ou estabelecimento avícola deve estar certificado como livre de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livre ou controlado para *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 1995).

3.3 MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA SPP.

Os métodos de tipagem de micro-organismos são baseados na caracterização fenotípica e genotípica. As técnicas baseadas em características fenotípicas utilizadas nas investigações epidemiológicas são biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, resistência a antimicrobianos e perfil de proteínas bacterianas (DARINI, 1994; BESSA, 2006). Porém, os métodos fenotípicos são limitados porque os micro-organismos podem alterar a expressão de genes e um mesmo genótipo apresentando fenótipos distintos (BUSCH; NITSCHKO, 1999).

As técnicas convencionais de microbiologia de alimentos utilizam meios de cultura não-seletivos e seletivos, testes bioquímicos diferenciais (biotipagem), e testes sorológicos (GANDRA et al., 2008).

A pesquisa de *Salmonella* spp. pelo método convencional é demorada (CATARAME et al., 2006; EYIGOR; CARLI; UNAL, 2002), e requer até três dias para obtenção de um resultado negativo e até 5 dias ou mais para a confirmação de positividade (CHEUNG; KWOK; KAM, 2007; SILVA et al., 2011).

Para a identificação de *Salmonella* spp. em alimentos é recomendado o pré-enriquecimento em caldo lactose ou água peptonada tamponada, seguido por enriquecimento seletivo em caldos Rappaport-Vassiliadis (RV), Tetrionato (TT) ou Selenito-Cistina (SC) (MACIOROWSKI et al., 2005; SALLES et al., 2008).

Posteriormente, alíquotas do enriquecimento são semeadas em meios seletivos e diferenciais, tais como, ágar Hektoen (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) e ágar Bismuto Sulfito (BS). As colônias suspeitas são submetidas à triagem bioquímica e, para confirmação de *Salmonella* spp., é realizado sorologia com anti-soros polivalentes somático e flagelar. A identificação do sorovar é realizada somente por laboratórios de referência (SILVA et al., 2007).

A sorotipagem é o método mais comum usado para diferenciar sorovares de *Salmonella* spp., que são definidos de acordo com a sua estrutura antigênica (TOZETTO, 2006). Esta técnica é uma ferramenta importante na vigilância de doenças veiculadas por alimentos, pois permite determinar a prevalência dos sorovares em zonas geográficas distintas, bem como identificar surtos, conhecer as fontes de infecção e vias de transmissão (YAN et al., 2003).

Para a indústria de alimentos, que retem os seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos, tempo prolongado de espera significa perdas econômicas (BENETTI, 2009). Por isso, métodos rápidos e sensíveis para a identificação de *Salmonella* spp. em diferentes matrizes alimentares são necessários (SCHRANK et al., 2001).

Atualmente, existem diversas técnicas imunológicas e moleculares para melhorar a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos (BAYLIS; MACPHEE; BETTS, 2000; EYIGOR; CARLI; UNAL, 2002; KUMAR; SURENDRAN; THAMPURAN, 2008a; O'REGAN et al., 2008; GALLEGOS-ROBLES et al., 2009; FREITAS et al., 2010).

Técnicas moleculares para identificação ou detecção de *Salmonella* spp. podem ser realizadas por eletroforese em gel em campo de pulsos alternados (PFGE) (EBNER; MATHEW, 2001; RIBOT et al., 2006), técnicas de sequenciamento (McCLELLAND et al., 2001; CHIU et al., 2005), análise de DNA polimórfico após amplificação (RAPD) (HILTON; BANKS; PENN, 1996; LIN et al., 1996; SANTOS et al., 2008), ribotipagem (ESTEBAN et al., 1993; MARTINS et al., 2006) e amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) (NAM et al., 2005; HEIN et al., 2006; O'REGAN et al., 2008; CARDONA-CASTRO et al., 2009; AKIBA; KUSUMOTO; IWATA, 2011; LIU et al., 2011; PUI et al., 2011).

3.4 PCR PARA SALMONELLA SPP.

A PCR foi desenvolvida em 1985 por Kary B. Mullis. Basicamente, o método consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores e da enzima DNA polimerase para sintetizar *in vitro* novas sequências do DNA. O ensaio é realizado em três etapas (desnaturação, hibridação dos iniciadores e polimerização da sequência alvo), que se repetem de 30 a 40 vezes, gerando 2^n cópias da região de interesse do DNA, onde n é igual ao número de ciclos da reação (GARCIA; MA, 2005; GANDRA et al., 2008; ALVES, 2010).

Esta técnica permitiu maior confiabilidade na identificação de micro-organismos em alimentos, e é uma importante ferramenta na investigação de surtos de toxinfecções alimentares (RIYAZ-UI-HASSAN; VERMA; QAZI, 2004). A rapidez, a sensibilidade e a especificidade na identificação de agentes bacterianos em comparação ao método convencional microbiológico fazem da PCR uma alternativa prática, dentre os métodos de diagnóstico de doenças transmitidas por alimentos (FRATAMICO, 2003; KUMAR; SURENDRAN; THAMPURAN, 2008b; RAMPERSAD et al., 2008; GOUVEIA, 2009; SILVA et al., 2011).

Os principais obstáculos da implantação da técnica de PCR na rotina laboratorial são: a incapacidade do método em diferenciar entre células vivas e mortas, a presença de inibidores da enzima DNA polimerase em certas matrizes alimentares, o alto investimento dos equipamentos e reagentes (MALORNY et al., 2003).

Com o objetivo de melhorar a especificidade e a eficiência da técnica existem variações da reação em cadeia da polimerase, como a RT-PCR (Reação da

Transcriptase Reversa), Nested-PCR, RFLP-PCR (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição), PCR ribotipagem, PCR em tempo real e PCRM (PCR Multiplex) (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008; GANDRA et al., 2008).

O surgimento da PCRM facilitou a detecção de diferentes espécies de microorganismos simultaneamente, porque utiliza mais do que um par de iniciadores para identificação de sequências específicas de DNA em uma mesma amostra (MACIOROWSKI et al., 2005) e tem grande potencial para ser aplicado na rotina laboratorial. A PCRM apresenta vantagens em relação a PCR convencional, pois reduz a intensidade e tempo de trabalho laboratorial, bem como o uso de reagentes e consequentemente os custos (PERRY et al., 2007).

Desde a sua primeira descrição, em 1988 (CHAMBERLAIN et al., 1988), a PCRM é utilizada com sucesso na detecção de diferentes microorganismos, tais como *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 em amostras de cidra, água de lavagem de carcaças bovinas, carne moída e fezes bovinas (FRATAMICO; STROBAUGH, 1998); *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado (GANDRA, 2006); *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum*, e *Yersinia ruckeri* em peixes (ALTINOK; CAPKIN; KAYIS, 2008); *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Typhimurium em frutas fatiadas (PUI et al., 2011); *Salmonella* spp. e *S. Enteritidis* em carcaças de frango (SILVA et al., 2011); *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em frutos do mar (KIM et al., 2012).

Porém a especificidade e o sucesso da PCR, especialmente da PCRM depende da escolha correta dos oligonucleotídeos iniciadores. Os iniciadores devem ser comuns à maioria das cepas, não apresentar homologia com outros microorganismos e codificar para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria *Salmonella* spp. (SANTOS et al., 2001; MACIOROWSKI et al., 2005). Isto porque, a patogenicidade de um micro-organismo está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência.

Toxinas, fímbrias e flagelos são chamados de fatores clássicos de virulência e genes que codificam essas características podem estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, denominados Ilhas de Patogenicidade (IP) (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

As IP são elementos genéticos responsáveis pelas características patogênicas da bactéria. A maioria dos fatores de virulência da *Salmonella* spp. é codificada por genes agrupados em IP chamadas de *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI) (VIEIRA, 2009). Atualmente, o gênero *Salmonella* possui 17 ilhas diferentes, sendo as SPI-1 e SPI-2 as mais estudadas (BARROW et al., 2010 apud BORGES, 2011).

Para a patogenicidade da *Salmonella* spp., a invasão é um fator de importante influência na virulência. O gene *invA* que codifica para a proteína de invasão celular está presente na ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) e é o gene alvo utilizado com maior frequência para a detecção desta bactéria pela técnica de PCR (DARWIN; MILLER, 1999; WANG et al., 2009). A sequência desse gene cromossomal é única para *Salmonella*, e está, possivelmente, presente em todos os sorovares (GÁLÁN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992; OLAH; SHERWOOD; LOGUE, 2005). Além do gene *invA*, outras sequências de genes são utilizadas para identificação ou detecção de *Salmonella* spp. por PCR, conforme ilustrado na tabela 2.

Tabela 2 – Genes alvos utilizados em Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação ou detecção de *Salmonella* spp

Gene	Iniciador	Características	Referência
<i>invA</i>	139, 141	Codifica proteína de invasão celular	Rahn et al. (1992)
	Sal-3, Sal-4		Wang; Cao; Cerniglia (1997)
	StyinvA-JHO-2		Hoorfar; Ahrens; Radström (2000)
	139, 141		Oliveira et al. (2003)
	139, 141		Eyigor et al. (2005)
	INVAF, INVAR		Fratamico; Strobaugh (1998)
	INVAF, INVAR		Silva et al. (2011)
<i>oriC</i>	Primers 1, 2	Codifica a origem de replicação do cromossomo	Fluit et al., (1993)
	M1, M2		Mahon et al. (1994)
	P1, P3		Elizaquivel; Aznar (2008)
<i>ompC</i>	S18, S19	Codifica uma proteína C da membrana externa responsável pela invasão da célula epitelial	Kwang; Littledike; Keen (1996)
	OMPCF, OPCRМ		Alvarez et al. (2004)
	OMPCF, OPCRМ		Freitas et al. (2010)
<i>stn</i>	ST11,ST14,ST15	Codificam as sequências do gene da enterotoxina stn	Aabo et al. (1993)
	ST11, ST14		Trkov et al. (1999)
	Stn-101,Stn-111		Makino et al. (1999)
<i>hns</i>	LHNS-531	Codifica uma proteína de ligação ao DNA de <i>Salmonella</i> spp.	Jones; Law; Bej (1993)
	RHNS-682		Bej et al. (1996)

Fonte: Adaptado de Maciorowski et al (2005).

Para identificação ou detecção do sorovar Enteritidis por PCR, dois diferentes iniciadores são frequentemente empregados (Tabela 3). O gene *sefA*, que codifica a fímbria Sef14 é encontrado também nos sorovares Blegdam, Gallinarum, Pullorum, Rostock, Seremban, e Typhi (TURCOTTE; WOODWARD, 1993) e o gene *scff* (AGRON et al., 2001), que é uma região do cromossomo relacionada com a invasão e infecção de aves e ovos, altamente específico para o sorovar Enteritidis (ALVAREZ et al., 2004; O'REGAN et al., 2008; FREITAS et al., 2010; HASSANEIN et al., 2011).

Tabela 3 – Genes alvos utilizados em Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação ou detecção do sorovar Enteritidis e Typhimurium.

Sorovar	Alvo	Iniciador	Características	Referência
SE	<i>SefA</i>	Sef167, Sef478	Absorção de macrófagos	Soumet et al. (1999)
		Sef167, Sef478 SEF14	e sobrevivência em infecções intraperitoneal	Malkawi; Gharaibeh (2004) Cortez et al.(2006)
SE	<i>Sfd I</i>	ENTF,ENTR	Invasão e infecção de aves e ovos	Agron et al. (2001)
		ENTF,ENTR		Alvarez et al. (2004)
		ENTF,ENTR		O'Regan et al. (2008)
		ENTF,ENTR		Freitas et al. (2010)
		Sdf-I-F, Sdf-I-R		Hassanein et al. (2011)
ST	<i>fimA</i>	Fim1A, Fim2A	Codifica a maior unidade	Cohen; Mechanda; Lin (1996)
		primer FimA	fimbrial do tipo 1	Moreira et al. (2008b)
ST	<i>iroB</i>	P1, P2, P3 iroBF, iroBR	Codifica um gene da glicosiltransferase	Bäumler; Heffron; Reissbrodt (1997) Shanmugasundaram et al. (2009)
ST	<i>rfbJ</i>	Rfbj-s, Rfbj-as Rfbj-s, Rfbj-as rfbJF, rfbJR	Codifica o gene da abequose sintase o qual é necessário para a síntese do antígeno O4	Lim et al. (2003) Zahraei-Salehi et al. (2007) Shanmugasundaram et al. (2009)
ST	<i>fliC</i>	Fli15, Tym	Codifica a flagelina de fase 1 (H1)	Soumet et al. (1999)
		Fli15, Typ04		Oliveira et al. (2002)
		Fli15, Typ04		Oliveira et al. (2003)
		Flic-s, Flic-as		Lim et al. (2003)
		Flic-s, Flic-as		Zahraei-Salehi et al. (2007)
		FlicF, FlicR		O'Regan et al. (2008)
		SfC-F, SfC -R		Lee et al. (2009)
		Fli15, Typ04		Nashwa; Mahmoud; Sami (2009)
		Fli15, Typ04		Pui et al. (2011)
		Flic-s, Flic-as Fli15, Typ04		Dilmaghani et al. (2011) Diana; Pui; Son (2012)

SE: *Salmonella* Enteritidis; ST: *Salmonella* Typhimurium.

Diversas sequências também já foram alvo para detecção do sorovar Typhimurium por PCRm (Tabela 3). Segundo O'Regan et al. (2008) e Hassanein et al. (2011), o gene *fliC* é o mais utilizado para diferenciar *S.*

Typhimurium de outros sorovares, embora está presente também no sorovar Kentucky.

Nos ensaios PCRm padronizados, na qual utiliza-se o gene *fliC* para detecção do sorovar Typhimurium, normalmente a especificidade da PCRm não é avaliada com o sorovar Kentucky e/ou testadas com poucos sorovares de *Salmonella* spp. Apesar deste problema, este gene alvo ainda é frequentemente utilizado para detectar *S. Typhimurium* por PCRm em alimentos como frutas fatiadas, suco de frutas e produtos avícolas (PUI et al., 2011; DILMAGHANI et al., 2011; DIANA; PUI; SON, 2012).

Sequências genômicas completas estão disponíveis para muitas cepas bacterianas de origem alimentar, e a análise comparativa destas sequências é uma poderosa ferramenta para melhorar a identificação de diversos patógenos. A genômica comparativa permite ainda, a identificação de novos genes alvo para melhorar as técnicas de diagnóstico (FITZGERALD; MUSSER, 2001; KIM et al., 2006).

Oligonucleotídeos com sequências de genes específicos para o sorovar Typhimurium não haviam sido mencionados até 2003. No entanto, de acordo com Chan et al. (2003) que realizaram um estudo genômico comparativo entre os sorovares de *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, a região entre os genes STM4488 a STM4497, a qual codifica uma enzima de restrição tipo II, está presente somente no sorovar Typhimurium. De fato, McCarthy et al. (2009) testaram uma sequência do gene STM4492, que codifica uma proteína citoplasmática para identificação de *Salmonella* Typhimurium e observaram que das 217 cepas testadas, incluindo o sorovar Kentucky, a sequência foi encontrada somente no sorovar Typhimurium.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados de *Salmonella* spp. e de outras espécies bacterianas empregadas neste trabalho (Tabela 4) pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR; a Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde (CCBS), sub-coleção de *Campylobacter* (CCAMP) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ; ao Laboratório Central do Estado (LACEN), São José dos Pinhais, PR e ao Instituto Biológico de São Paulo (IB/CAPTAA), Descalvado, SP. *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram utilizados como controle positivo.

Tabela 4 – Isolados bacterianos utilizados neste estudo e suas procedências.

Isolados de <i>Salmonella</i>		Outros isolados bacterianos	
Sorovar	Procedência	Micro-organismo	Procedência
S. Adelaide	LACEN ¹	<i>Bacillus cereus</i>	UEL ^c
S. Anatum	LACEN ^a	<i>Campylobacter coli</i> CCAMP 1003	FIOCRUZ ²
S. Agona	UEL ³	<i>C. coli</i> CCAMP 1008	FIOCRUZ ^b
S. Bredeney	LACEN ^a	<i>C. coli</i> CCAMP 595	FIOCRUZ ^b
S. Dublin	LACEN ^a	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	FIOCRUZ ^b
S. Dublin	UEL ^c	<i>C. jejuni</i> CCAMP 971	FIOCRUZ ^b
S. Derby	LACEN ^a	<i>C. jejuni</i> CCAMP 594	FIOCRUZ ^b
S. <i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 4,5,12:i	LACEN ^a	<i>C. jejuni</i> CCAMP 1014	FIOCRUZ ^b
S. <i>enterica</i> <i>houtanae</i>	LACEN ^a	<i>Citrobacter freundii</i>	UEL ^c
S. Enteritidis	LACEN ^a	<i>Enterobacter aerogenes</i>	UEL ^c
S. Enteritidis	UEL ^c	<i>E. cloacae</i>	UEL ^c
S. Enteritidis ATCC 13076	UEL ^c	<i>Escherichia coli</i>	UEL ^c
S. Infantis	LACEN ^a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UEL ^c
S. Infantis	UEL ^c	<i>Morganella morganii</i>	UEL ^c
S. Johannesburg	LACEN ^a	<i>Proteus mirabilis</i>	UEL ^c
S. Kentucky	IB ⁴	<i>Shigella sonnei</i>	UEL ^c
S. London	LACEN ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>	UEL ^c
S. Montevideo	UEL ^c	<i>S. saprophyticus</i>	UEL ^c
S. Muenchen	LACEN ^a		
S. Newport	LACEN ^a		
S. Newport	UEL ^c		
S. Panama	LACEN ^a		
S. Senftenberg	LACEN ^a		
S. Typhi	LACEN ^a		
S. Typhi	UEL ^c		
S. Typhimurium	LACEN ^a		
S. Typhimurium	UEL ^c		
S. Typhimurium ATCC 14028	UEL ^c		

¹ LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Unidade Guatupê, São José dos Pinhais, PR

² FIOCRUZ, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ.

³ UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

⁴ IB, Instituto Biológico de São Paulo, Descalvado, SP.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

4.2.1 Extração do DNA

Os isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram cultivados em caldo infusão cérebro e coração (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia) a 37°C por 24 h até atingir a concentração entre 10^7 e 10^8 UFC/mL. Alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 14000 x *g* por 10 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi lavado com 1 mL de água peptonada a 1% esterilizada (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), centrifugado por 10 min a 14000 x *g* (TA) e ressuspenso com 300 de solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) (ALBOLMAATY et al., 2000). As suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min, centrifugadas por 5 min a 14000 x *g* (TA) e o sobrenadante foi utilizado para a purificação e como DNA alvo para a PCR.

4.2.2 Purificação de DNA

Após a extração do DNA, conforme o item 4.2.1, foi adicionado a uma alíquota de 250 µL do sobrenadante igual volume de solução fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25: 24: 1). A mistura foi agitada e centrifugada a 13000 x *g* por 10 min (TA). A fase aquosa foi transferida para novo tubo, no qual foram adicionados 30 µL acetado de sódio (3M) e 270 µL de etanol. Os tubos foram agitados por inversão, mantidos 2 horas a -20°C, e centrifugados a 13000 x *g* por 10 min (TA). O precipitado foi lavado com etanol 70%, e centrifugado como descrito anteriormente. O precipitado foi seco em estufa a 37°C e ressuspenso em 20 µL de água deionizada (SAMBROOK; RUSSELL, 2006). O DNA foi usado como alvo para a PCR.

4.2.3 PCRm para Detecção de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

Para identificação do gênero *Salmonella* spp. e dos sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* foram utilizados o fragmento de 119 pb do gene *invA* (StyinvA-JHO-2-left e StyinvA-JHO-2-right) (HOORFAR; AHRENS; RADSTRÖM,

2000), o fragmento do gene *sdfI* (ENTF e ENTR) de 299 pb (O'REGAN et al., 2008) e o fragmento de 759 pb do gene STM4492 (McCARTHY et al., 2009), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação PCRm para detecção de *Salmonella* spp, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

oligonucleotídeo iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
Stylnva-JHO-2 Hoofar; Ahrens; Radström (2000)	AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC	199pb
ENT O'Regan et al. (2008)	AAA TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG GGT CGT TCT TCT GGT ACT TAC GAT GAC	299pb
STM4492 McCarthy et al. (2009)	ACA GCT TGG CCT ACG CGA G AGC AAC CGT TCG GCC TGA C	759pb

A PCRm foi realizada com 0,3 μ M dos iniciadores Stylnva-JHO-2-left e Stylnva-JHO-2-right (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 0,4 μ M de ENTf e ENTR (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol) e 0,4 μ M de STM4492F e STM4492R (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol). O volume final da reação foi de 20 μ L, contendo 4 μ L de DNA, 2 μ L de tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 0,6 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA) e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de amplificação conduzidas no termociclador (TC-412) (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) foram de desnaturação inicial 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 s, hibridação dos iniciadores a 60°C por 90 s, polimerização da sequência alvo a 72°C por 90 s e polimerização da sequência alvo final de 10 min a 72°C.

A temperatura ótima de hibridação foi determinada após realização de PCR com gradiente de temperatura, na qual foram testadas: 56°C; 57°C; 58°C; 59°C; 60°C e 61°C.

4.2.4 Análise dos Produtos de Amplificação

Após a amplificação, foram adicionados 4 uL de tampão de amostra [Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, EUA) 15%; azul de bromofenol (Synth) 0,25%]. Aliquotas de 10 uL dessa mistura foram analisadas em gel de agarose (BioAmerica, Miami, FL, USA) a 1,5% acrescidos de 0,02 uL/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen).

A eletroforese foi realizada a 80 V e 70 min, em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM]. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV em transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

4.2.5 Análise da Especificidade dos Oligonucleotídeos Iniciadores

A avaliação da especificidade dos iniciadores foi realizada com diversos sorovares de *Salmonella* spp. e com diferentes espécies bacterianas frequentemente encontradas em alimentos, conforme descritos na Tabela 5. *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram utilizados como controle positivo. O DNA dos micro-organismos testados foi extraído com solução de lise TZ e fervura e utilizado para o teste de especificidade.

4.2.6 Avaliação do Limite de Detecção do Ensaio PCRm

O limite de detecção foi determinado com suspensões de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 cultivadas em caldo BHI (HiMedia) a 37°C por 24h e extraídas pelo método de fervura. Diluições seriadas foram feitas com água peptonada tamponada 0,1% (Becton, Dickinson and Company) para obtenção de suspensões de 10^0 a 10^8 UFC do sorovar *Enteritidis* e *Typhimurium* por mL.

As concentrações celulares foram estimadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD, Becton, Dickinson and Company) pelo método de contagem em gotas (MILES; MISRA,1938) e incubadas a 37°C por 24h.

4.3 ANÁLISE POR PCR DA CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

Porções de 25g de peles de frango não contaminada com *Salmonella* spp. foram adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada (Becton, Dickinson and Company) e massageadas manualmente por 30 s. Alíquotas de 50 mL de cada um dos homogeneizados foram inoculadas com 1mL de suspensões de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* separadamente, para obtenção de aproximadamente 10^{-1} a 10^8 UFC/mL. Os frascos contendo os enxágues contaminados foram incubados a 37°C por 24 horas. Após este período, 1 mL do enxágue foi utilizado para extração do DNA por fervura e o material obtido submetido ou não a purificação, testado na PCR.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E PCR DA CARNE DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADAS

Cento e duas amostras de carne de frango resfriadas foram adquiridas em estabelecimentos comerciais dos municípios de Presidente Prudente, SP e de Londrina PR, entre Agosto e Outubro de 2011. Alíquotas de 25g de pele de cortes resfriados de frango, tais como, peito, coxas e sobre-coxas foram adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada (Becton, Dickinson and Company), homogeneizadas manualmente e incubadas a 37°C por 24 h (pré-enriquecimento não seletivo).

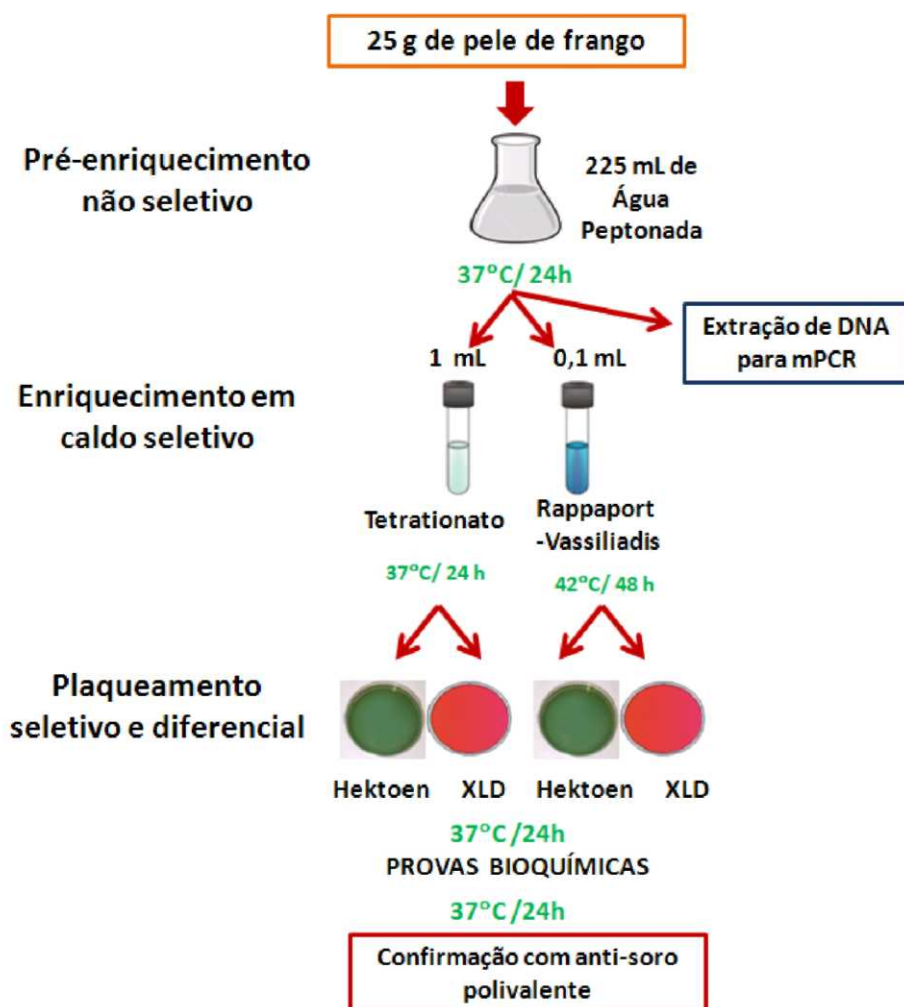
4.4.1 Pesquisa de *Salmonella* spp. Pelo Método Microbiológico Convencional

A metodologia convencional é preconizada em muitos países como método oficial de diagnóstico de *Salmonella* spp., inclusive no Brasil (BRASIL, 2003b). Por esta razão é considerada como método de referência para avaliar o desempenho de novas técnicas de diagnóstico.

Após o enriquecimento não seletivo em água peptonada, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo TT (HiMedia) e em 10 mL de caldo RV (HiMedia). O caldo TT foi incubado a 37°C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Após esses períodos, as amostras foram semeadas em ágar Hektoen (Becton, Dickinson and Company) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) (Becton, Dickinson and Company), incubados a 37°C por 24 h.

Colônias características de *Salmonella* spp. que promoveram a descarboxilação da lisina, hidrólise da uréia, motilidade e a não produção de indol foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Becton, Dickinson and Company) (Figura 1).

Figura 1 – Esquema da metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de carne de frango, segundo a ISO 6579:2002.



4.4.2 Pesquisa de *Salmonella* spp. e Sorovares Enteritidis e Typhimurium por PCRm

Realizou-se a extração de DNA por fervura de 1 mL do pré-enriquecimento não seletivo de *Salmonella* spp. (Figura 1). O DNA obtido sem a purificação foi utilizado na PCRm padronizada.

4.5 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCRm PADRONIZADA

A sensibilidade e a especificidade da PCRm padronizada foram calculadas considerando a metodologia convencional como referência, de acordo com as seguintes fórmulas (MÀDE et al., 2004; MATIAS, 2008):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{NPS}}{\text{NP}} \times 100 \quad \text{Especificidade} = \frac{\text{NNS}}{\text{NN}} \times 100$$

Onde:

NPS: Número de resultados positivos simultaneamente na metodologia convencional (referência) e testada (PCRm);

NP: Número de resultados positivos na metodologia convencional (referência); NNS: Número de resultados negativos simultaneamente na metodologia convencional (referência) e testada (PCRm);

NN: Número de resultados negativos na metodologia convencional (referência).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 NOVA PCRM PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E DIFERENCIAÇÃO SIMULTÂNEA DOS SOROVARES ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM EM CARNE DE FRANGO

Este item está apresentado na forma de uma nota (*short communication*), que será submetida à revista *Molecular and Cellular Probes*.

Nova PCRm para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em carne de frango

Erika Kushikawa Saeki⁵⁶, Raissa Curti Bonfante^a, Juliane Alves^a, Elisa Yoko Hirooka^a e Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira^a

Endereço postal completo de cada filiação:

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55-43-3371-4565; Fax: +55-43-3371-4080.

Endereço de e-mail de cada autor:

Erika Kushikawa Saeki: erikaksaeki@gmail.com

Raissa Curti Bonfante: raissa_curti@hotmail.com

Juliane Alves: julianealves@yahoo.com.br

Elisa Yoko Hirooka: elisahirooka@hotmail.com

Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira: terezaoliveira@yahoo.com

Resumo: A inespecificidade de genes alvo em PCR multiplex (mPCR) para a diferenciação de *Salmonella* Typhimurium pode comprometer o emprego da técnica apesar de sua reconhecida sensibilidade. A PCRm proposta permite a detecção de *Salmonella* spp., e diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango com elevada especificidade e sensibilidade

Palavras-chave: PCR multiplex. Salmonelose. Solução TZ e sorovares.

⁵ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

⁶ **Correspondência do autor:** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55-43-3371-4565; Fax: +55-43-3371-4080; e-mail: erikaksaeki@gmail.com

Técnicas moleculares são amplamente empregadas na detecção de *Salmonella* spp. em alimentos devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium são os principais responsáveis por salmonelose humana em vários países, inclusive no Brasil [1-3]. Métodos capazes de detectar e diferenciar esses sorovares em fontes alimentares são necessários para assegurar que medidas adequadas de prevenção sejam adotadas.

A Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (PCRm) utiliza pares de oligonucleotídeos iniciadores que permitem a detecção e a identificação simultânea de diferentes sequências específicas de DNA em uma mesma amostra [4]. Diversos ensaios PCRm para a detecção e identificação individual ou simultânea dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em alimentos já foram desenvolvidos anteriormente, empregando o gene *flic* como alvo para a detecção específica do sorovar Typhimurium [5-11]. Entretanto, a especificidade deste gene é questionável, pois também já foi descrito para *S. Kentucky*. [12,13]. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma nova proposta de PCRm para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango.

A mPCR proposta foi ensaiada com 22 sorovares de *Salmonella* (Adelaide; Anatum; Agona; Bredeney; Dublin; Derby; 4,5,12:1; *S. enterica* subsp. *houtanae*; Enteritidis, Enteritidis ATCC 13076; Infantis, Johannerburg; Kentucky; London; Montevideo; Muenchen; Newport; Panama; Seftenberg; Typhi; Typhimurium e Typhimurium ATCC 14028), além de outros isolados bacterianos de importância em alimentos (*Bacillus cereus*; *Campylobacter coli* CCAMP 1003; *C. coli* CCAMP 1008; *C. coli* CCAMP 595; *C. jejuni* ATCC 33291; *C. jejuni* CCAMP 971; *C. jejuni* CCAMP

594; *C. jejuni* CCAMP 1014; *Citrobacter freundii*; *Enterobacter aerogenes*; *E. cloacae*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Morganella morganii*; *Proteus mirabilis*; *Shigella sonnei*; *Staphylococcus aureus* e *S. saprophyticus*). Cepas de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram utilizadas como controle positivo e para a determinação do limite de detecção do ensaio, realizado com suspensões de 10^0 a 10^8 UFC/mL desses sorovares em caldo BHI (HiMedia, Mumbai, Índia).

A extração do DNA foi realizada com alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas cultivadas em caldo BHI (HiMedia) e centrifugadas a 14000 x g por 10 min. Cada precipitado foi lavado com 1 mL de água peptonada a 1% (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), centrifugado por 10 min. a 14000 x g e ressuspendido com 300 μ L de solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) [14]. As suspensões foram fervidas a 100°C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min, centrifugadas por 5 min a 14000 x g e o sobrenadante com o DNA foi utilizado para o ensaio PCRm.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador TC-412 (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) com o volume final de 20 contendo 4 μ L do sobrenadante com o DNA alvo, 2 de tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4; Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,6 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 0,3 M dos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right; 0,4 M de ENTf e ENTR e 0,4 μ M de STM4492F e STM4492R (Tabela 1) e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação consistiu em desnaturação inicial 95°C a 10 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 60 s, hibridação a 60°C por 90 s, polimerização a 72°C por 90 s e polimerização final de 10 min a 72°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% contendo 0,02 μ L/mL de SYBR® Safe 10.000x em DMSO (Invitrogen). O DNA de 100 pb (Invitrogen) foi utilizado como marcador de massa molecular.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCRm para detecção e diferenciação de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

oligonucleotídeo iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
Styinva-JHO-2 [15]	AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC	199pb
ENT [12]	AAA TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG GGT CGT TCT TCT GGT ACT TAC GAT GAC	299pb
STM4492 [16]	ACA GCT TGG CCT ACG CGA G AGC AAC CGT TCG GCC TGA C	759pb

A pesquisa de *Salmonella* spp. pelo método convencional foi conduzida em paralelo nas mesmas amostras de carne de frango de acordo com o protocolo preconizado pela ISO 6579: 2002 [17].

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2, ENT e STM4492 foram específicos, respectivamente para *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Não foi observado nenhum produto de amplificação nas reações contendo DNA das demais bactérias analisadas.

Diferentes sequências alvo (*iroB*, *fimA*, *rfbJ*, e *fliC*) foram anteriormente utilizadas em ensaios de PCR e PCRm para detectar o sorovar Typhimurium [5, 10-12, 18-19], sendo o gene *fliC* que codifica a flagelina de fase 1 (H1), o mais utilizado para diferenciar este sorovar dos demais. No entanto, o gene *fliC* é descrito também para o sorovar Kentucky que possui o antígeno H:i [12,13].

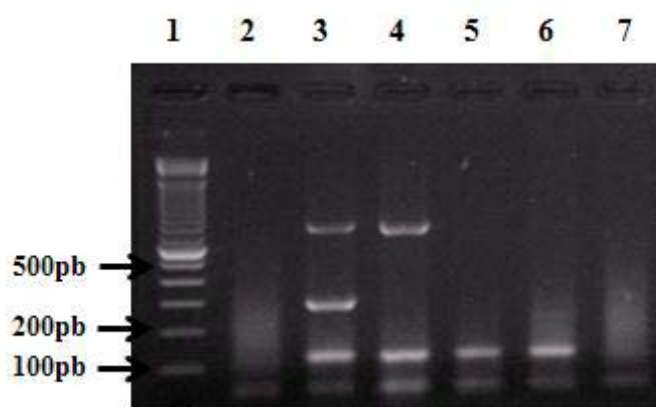
No presente estudo foi utilizado o gene STM4492 para diferenciar *S. Typhimurium*, que nunca havia sido utilizado em ensaio multiplex para diferenciação desse sorovar. O ensaio PCRm mostrou elevada especificidade com capacidade de diferenciar *S. Typhimurium* dos 22 sorovares de *Salmonella* testados, incluindo *S. Kentucky*. Chan et al. [20] compararam genes de *S. Typhimurium* com outros sorovares por microarranjo de DNA e concluíram que a região entre os genes STM4488 a STM4497 estava presente somente no sorovar Typhimurium. McCarthy et al. [16] testaram o gene STM4492 com 217 cepas, incluindo o sorovar Kentucky, e observaram 100% de especificidade para sorovar Typhimurium.

O limite de detecção da PCRm padronizada no presente estudo foi de 10^5 UFC/mL. Este limite com a extração do DNA por método de fervura é satisfatório uma vez que é uma reação para detecção simultânea de três amplicons. Lim et al. [21] também observaram limite de detecção de 10^5 UFC/mL utilizando três pares de iniciadores para detecção de *S. Typhimurium*. Germini et al. [22] desenvolveram uma PCRm para detecção de três patógenos (*Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*) e encontraram limite de detecção de 10^6 UFC/mL.

O ensaio foi testado com cento e duas amostras de carne de frango resfriadas disponíveis comercialmente. Dentre estas, noventa e duas amostras tiveram resultados negativos tanto pelo método convencional como pela PCRm, evidenciando 100% de sensibilidade para o método aqui proposto. Das dez amostras de carne de frango positivas pela PCRm, cinco foram negativas pela técnica convencional, que apresentou 94,8% de especificidade do ensaio PCRm. Em uma das amostras positivas foi identificado *S. Typhimurium* (Figura 1), enquanto

que os sorovares das outras amostras positivas não puderam ser identificadas pela PCRm.

Figura 1 – Análise por PCRm de amostras de carne de frango. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028; 4) amostra naturalmente contaminada com *S. Typhimurium*; 5-6) amostras naturalmente contaminadas com *Salmonella* spp.; 4.7) amostra negativa para *Salmonella* spp.



A maior positividade obtida neste trabalho pela PCR em relação ao método convencional já foi relatada por outros pesquisadores [10, 12, 23]. As bactérias podem estar injuriadas ou mortas, e por isso não são detectadas pelo método convencional, mesmo após enriquecimento [12]. Diferentes bactérias, incluindo *Salmonella* spp. são capazes de entrar em estado viável, mas não cultivável, e embora possam manter a sua viabilidade não podem ser recuperadas por métodos de cultura [24]. Isto poderia explicar os resultados negativos no método convencional de cultura e positivas na PCRm observados neste trabalho.

A PCRm padronizada neste trabalho apresentou sensibilidade e especificidade satisfatória para detecção de *Salmonella* spp. e diferenciação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango. O método tem potencial para ser utilizado na rotina laboratorial, pois pode reduzir o tempo de obtenção de resultados presuntivos positivos. Além disso, é uma ferramenta promissora para a identificação específica dos sorovares Enteritidis e Typhimurium a partir de cepas isoladas pelo método convencional.

Referencias Bibliográficas

- [1] Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. J Appl Microbiol 2007; 103: 1366-1375.
- [2] Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahão WSM, Rodrigues DP. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. Acta Sci Health Sci 2010; 32: 9-15.
- [3] Fearnley E, Raupach J, Lagala F, Cameron S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia. Int J Food Microbiol 2008; 146: 219-227.
- [4] Maciorowski KG, Pillai SD, Jones FT, Ricke SC. Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. Crit Rev Microbiol 2005; 31:45-53.
- [5] Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. Lett Appl Microbiol 1999; 28: 113-117.
- [6] Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva, AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Vet Microbiol; 2002: 25-35.
- [7] Malkawi HI, Gharaibeh R. Rapid and Simultaneous identification of two *Salmonella enterica* serotypes, Enteritidis and Typhimurium from chicken and meat products by multiplex PCR. Biotechnol 2004; 3:44-48.
- [8] Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, et al. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium and Enteritidis in meats. J Vet Sci 2009; 10:43-51.
- [9] Nashwa MH, Mahmoud AH, Sami SA. Application of multiplex polymerase chain reaction (PCRm) for identification and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. J Appl Sci Res 2009; 5:2343-2348.
- [10] Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control 2001; 22:337-342.
- [11] Diana JE, Pui CF, Son R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. Int Food Res J 2012; 19: 51-56.
- [12] O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, Whyte P, Fanning S. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of

- multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. BMC Microbiol 2008; 8: 1-11.
- [13] Hassanein R, Ali SFH, El-Malek AMA, Moemen, Mohamed A, Elsayh KI. Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. Vet World 2001; 4:5-11.
- [14] Albomaaty A, Vu C, Oliver J, Levin RE. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. Microbios 2000; 101:181-189.
- [15] Hoorfar J, Ahrens P, Rådström P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. J Clin Microbiol 2000; 38:3429-3435.
- [16] McCarthy N, Reen FJ, Buckley JF, Frye JG, Boyd EF, Gilroy D. Sensitive and Rapid Molecular Detection Assays for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg. J Food Prot 2009; 72: 2350-2357.
- [17] ISO, 2002 (ISO 6579). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for Detection of *Salmonella*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- [18] Baumler AJ, Heffron F, Reissbrodt R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. J Clin Microbiol 1997; 35:1224-1230.
- [19] Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali HS, Batra HV. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fljB*, *invA*, *rfbJ*, *STM2755*, *STM4497* genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. World J Microbiol 2009; 25:1385-1394.
- [20] Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G, Falkow. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. J Bacteriol 2003; 85: 553-563.
- [21] Lim Y-H, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh K-I, Tamura K, Kim S-I, Watanabe H. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis 2003; 56:151-155.
- [22] Germini A, Masola A, Carnevali P, Marchelli R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. Food Control 2009; 20:733-738.
- [23] Löfstrom C, Knutsson R, Axelsson CE, Rådström P. Rapid and Specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 69-75.
- [24] Smith RJ, Newton AT, Harwood CR, Barer MR. Active but non-culturable cells of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium do not infect or colonize mice. Microbiology 2002; 148: 2717-2726.

5.2 INFLUÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO POR FERVURA EM ENSAIOS DE PCRm PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP.

A principal limitação da PCR é a presença de substâncias inibitórias que prejudicam a extração e a qualidade do DNA. Por isso, a seleção do método de extração do DNA é uma etapa importante para o sucesso da PCR (AMAGLIANI et al., 2007). Com o objetivo de avaliar a necessidade de purificação do DNA após extração com solução de lise TZ (2% Triton X-100, 2,5 mg azida sódica em 0,1M tampão Tris-HCl a pH 8,0) e fervura foram conduzidos ensaios de PCRm utilizando carne de frango artificialmente contaminada antes e após a purificação com fenol / clorofórmio / álcool isoamílico.

Após 24h de enriquecimento não seletivo das amostras de carne de frango artificialmente contaminadas, o ensaio de PCRm foi capaz de detectar 1 a 10 UFC/mL de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 com extração do DNA por fervura. Após a purificação com fenol, foi capaz de detectar 1 UFC/mL de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Figura 2, 3, 4 e 5).

A etapa de enriquecimento permite a diluição de substâncias inibitórias, diferenciação de células viáveis e não viáveis, e a recuperação de células injuriadas. Pode ainda contribuir para a multiplicação das células e aumento da quantidade de DNA para facilitar a extração (ALVES, 2010; TREVANICH; TIYAPONGPATTANA; MIYAMOTO, 2010).

Figura 2 – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura em amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-10) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Enteritidis*.

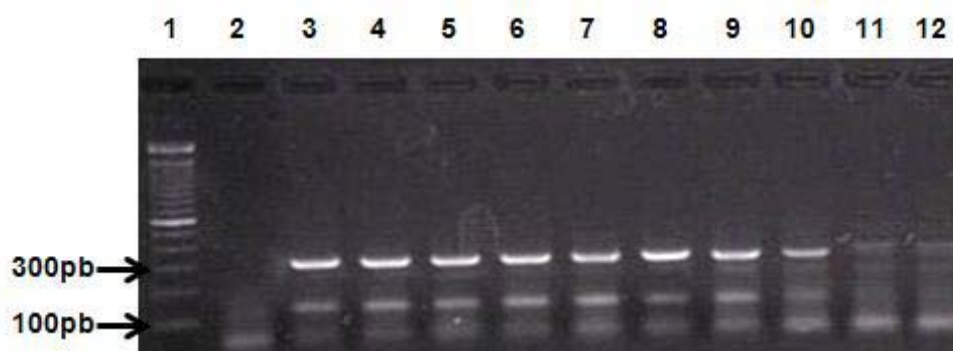


Figura 3 – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura em amostras artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^0 UFC/mL de *S. Typhimurium*.

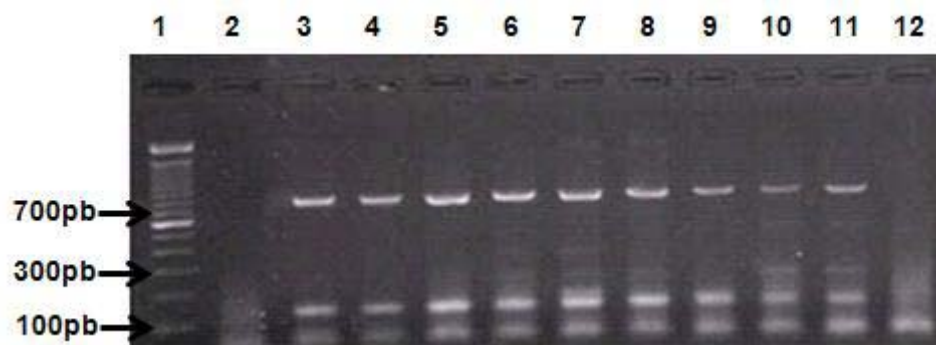


Figura 4 – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura seguida de purificação em amostras artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Enteritidis*.

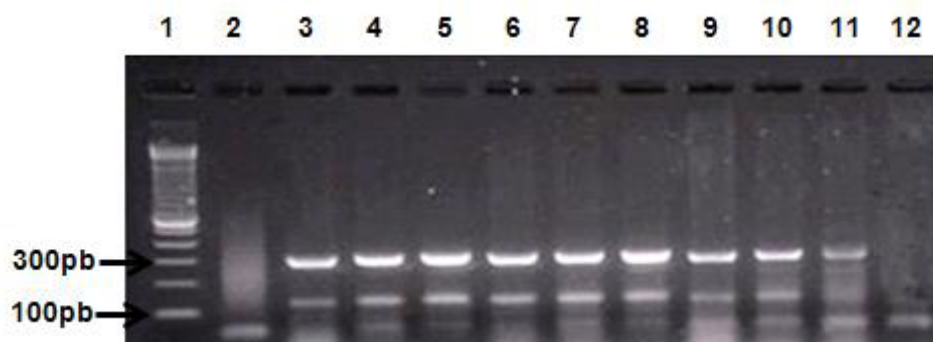
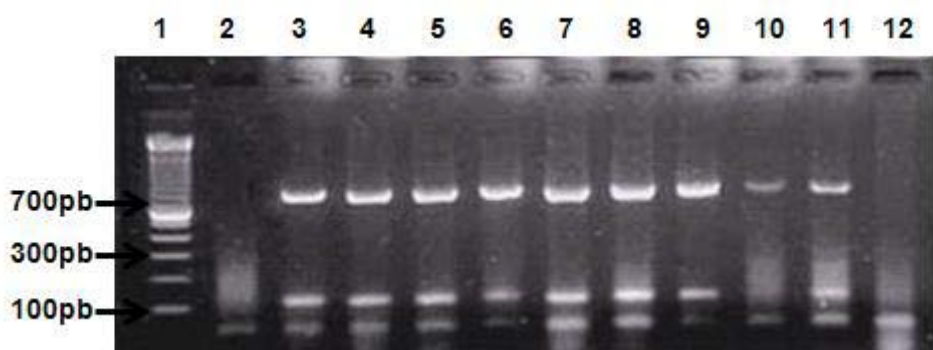


Figura 5 – Resultado da PCRm pelo método de extração com solução de lise TZ e fervura seguida de purificação em amostras artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*. 1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-11) suspensões bacterianas contendo de 10^8 a 10^1 UFC/mL de *S. Typhimurium*.



A solução de lise TZ foi utilizada com sucesso na extração de DNA de diversos micro-organismos, tais como, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Vibrio vulnificus* (ALBOMAATY et al., 2000; DUODU et al., 2009; LEE; LEVIN, 2009; ALVES, 2010). Segundo Albomaaty et al. (2000), a extração de DNA de *S. Enteritidis* com a adição de azida sódica foi mais eficiente que a extração somente com a solução de Triton X - 100.

A purificação do DNA empregada no presente estudo teve como objetivo separar os ácidos nucleicos de outras moléculas, empregando fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O princípio dessa separação é a diferença de solubilidade dos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, de forma que após a separação se obtém uma fase aquosa onde se encontra os ácidos nucleicos. Após esta fase, o DNA deve ser precipitado por centrifugação com adição de etanol (MESQUITA et al., 2001).

Quando se compara as duas metodologias empregadas, a extração por fervura com a solução de lise TZ é mais vantajosa, por ser mais rápida, simples, requer menor manipulação da amostra e economia. Oferece menos riscos à saúde do manipulador e causa menos impactos ao meio ambiente. No método que se emprega a solução fenólica são necessárias etapas adicionais de manuseio das amostras, o que pode levar a contaminações cruzadas ou perda do DNA alvo.

Flôres et al. (2001), ao utilizar os métodos de extração de DNA por fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, e por fervura, observaram que o primeiro foi mais efetivo na recuperação de *Salmonella* spp. em ovos. A extração por fervura, no entanto, apresentou vantagem na redução do tempo de diagnóstico em seis horas, pouca manipulação das amostras e custo menor.

Freschi; Carvalho; Oliveira (2005) compararam três métodos de extração: 1) fervura; 2) lise celular seguida de extração com fenol-clorofórmio; 3) kit comercial (Puregene, Gentra Systems), na eficiência em detectar *Salmonella* Typhimurium em amostras de fezes suínas artificialmente contaminadas. Ao serem considerados custo e eficiência, a técnica de extração do DNA por fervura representou a melhor opção. Outros autores como Alvarez et al. (2004); Kumar et al. (2006), Halatsi et al. (2006), Raj et al. (2011) e Silva et al. (2011) também utilizaram com sucesso o método de extração de DNA da *Salmonella* spp. por fervura.

A partir de um estudo realizado por Niguma (2011), ao se comparar os métodos de extração de DNA com solução de lise TZ e fervura, seguida ou não

de purificação, concluiu-se que a purificação do DNA com fenol / clorofórmio / álcool isoamílico permite manter a integridade do DNA por um período superior (pelo menos 10 dias) ao DNA extraído com solução TZ e fervura (4 dias). No entanto, devido à simplicidade e custo da extração com solução TZ e fervura, esse método é adequado para ser utilizado nos laboratórios de rotina.

5.3 ANÁLISE DE CARNES DE FRANGO NATURALMENTE CONTAMINADAS PELA TÉCNICA CONVENCIONAL

Das 102 amostras de carne de frango adquiridas no comércio e avaliadas neste trabalho, cinco (4,9%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Essa percentagem de contaminação está de acordo com os resultados das pesquisas realizadas a partir de 2007 no Brasil.

O isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango diminuiu gradativamente nos últimos 10 anos. No Estado do Paraná, Gasparetto et al. (2001) relataram a presença de *Salmonella* spp. em 20,0% (n = 100) das amostras de carne de frango comercializadas na cidade de Londrina, PR. Destas 20 amostras positivas, isolou-se *S. Enteritidis* em 60% das amostras. Em 2006, a presença de *Salmonella* spp. foi constatada em 14,3% das carcaças de frango (n = 363), provenientes de abatedouros inspecionados pelo serviço de fiscalização federal no estado de Goiás. Houve a maior isolamento de *S. Albany* seguida do sorovar *Enteritidis* (MOREIRA et al., 2008a). No ano de 2007, nove (13,0%) das 66 amostras de carcaças de frango comercializadas em Londrina, PR, estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Os sorovares predominantes foram os Schawarzengrund e Montevideo (SILVA et al., 2011). Tessari et al. (2008) analisaram entre 2006 e 2007, 116 carcaças de frango congeladas obtidas de abatedouros do estado de São Paulo e três amostras (2,6%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. sendo uma identificada como *S. Enteritidis* (0,8%). Freitas et al. (2010) analisaram 127 carcaças de frango em 2008 no Distrito Federal e nenhuma foi positiva para *Salmonella* spp. Em 2010, duas (4,0%) entre cinquenta amostras de carne de frango adquiridas no comércio de Londrina, PR estavam contaminadas com *Salmonella* spp. (ALVES, 2010). Segundo Frausto (2011), um total de 242 (4,1%) das 5.845 amostras de carne de frango analisadas entre 2009 e 2010, provenientes de diferentes regiões do Paraná, estavam contaminados com *Salmonella* spp. A partir das cepas isoladas e

sorotipadas, o sorovar Minnesota foi o mais isolado (15,7%), seguido de Mbandaka (9,5%), Schwarzengrund (8,4%), Saintpaul (7,8%) e Enteritidis (7,3%) (FRAUSTO, 2011).

A diminuição na frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango pode ser consequência da implantação do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), estabelecido em 1995 e do Programa Nacional de Redução de Patógenos implantado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2003, que confere o controle minucioso sobre o processo de abate de aves e atende as exigências de segurança do alimento baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 2003a).

A vacinação para *S. Enteritidis* das matrizes de corte pode também ter contribuído para a redução de *Salmonella* spp. em carne de frango, o que poderia justificar a menor frequência de isolamento do sorovar Enteritidis nos últimos anos. Porém, ainda não é possível saber se esta diminuição na porcentagem de contaminação por *Salmonella* spp. e, principalmente, do sorovar Enteritidis levou a um impacto positivo na Saúde Pública devido a falta de dados epidemiológicos no Brasil. Da mesma maneira que medidas de biossegurança contra *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* permitiram a emergência de *Salmonella* Enteritidis, as medidas adotadas atualmente para o seu controle poderão resultar na substituição deste sorovar (FRAUSTO, 2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos e os oligonucleotídeos iniciadores selecionados foram eficientes na amplificação dos fragmentos de DNA de 119 pb do gene *invA* de *Salmonella* spp., 299 pb do gene *sdf* de *S. Enteritidis* e 759 pb do gene STM4492 de *S. Typhimurium*.

A PCRm após a extração do DNA com solução de lise TZ e fervura desenvolvida é uma alternativa rápida, barata e sensível para detecção e identificação de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em carne de frango.

Dada a importância dos surtos de salmonelose na saúde pública, este trabalho pode ser utilizado como técnica alternativa para identificação específica dos sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* a partir de cepas isoladas e como ferramenta de triagem rápida seguida de confirmação da presença de *Salmonella* spp. pelo método convencional microbiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S. et al. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.7, p.171-178, 1993.
- ABEF. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. **Produção Mundial de carne de frango**. Disponível em <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em 28 abr 2011.
- AGRON, P.G. et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4984-4991, 2001.
- AKIBA, M.; KUSUMOTO, M.; IWATA, T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum by multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 9-15, 2011.
- ALBOMAATY, A. et al. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. **Microbios**, v. 101, p. 181-189, 2000.
- ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004**. Londrina. 2004. 216f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- ALMEIDA, P.F.; SILVA, E.N.; ALMEIDA, R.C.C. Contaminação e disseminação bacterianas de carcaças de frangos em abatedouros. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 27, p. 12-17, 1993.
- ALTINOK, I.; CAPKIN, E.; KAYIS, S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p.332-338, 2008.
- ALVAREZ, J. et al. Development of a multiplex PCR technique of detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 1734-1738, 2004.
- ALVES, J. **PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- AMAGLIANI, G. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. **Food Control**, v. 18, p. 1137-1142, 2007.
- AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 4. ed. Ames: Blackwell Publising, 2010. p. 231-266.

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

BAÜMLER, A.J.; HEFFRON; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for iroB. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1224-1230, 1997.

BAYLIS, C.L.; MACPHEE, S.; BETTS, R.P. Comparison of methods for the recovery and detection of low levels of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder. **Letters Applied Microbiology**, v. 30, p. 320-324, 2000.

BEJ, A.K. et al. Detection of *Salmonella* in chicken meat using PCR. **Food Testing & Analysis**, v. 2, p. 17-20, 1996.

BENETTI, T.M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em linguças resfriadas comercializadas no estado do Paraná**. 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BORGES, K.A. **Pesquisa de genes à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 193 de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA e cria Comitê Consultivo do PNSA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126, de 06 de novembro de 1995. Normas para diagnóstico das salmoneloses aviárias. Anexo I - Descrição das técnicas/métodos bacteriológicos e sorológicos para diagnóstico das salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 nov.1995, Seção 1, n.212, p.17694-17698.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003a. **Diário Oficial da União** de 10/10/2003, seção 1, p.9.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003, Seção 1, p. 14, 2003b.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1-2, p. 263-278, 1999.

CÂMARA, S.A.V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998-001**. 2002. 79f. Monografia (Especialista em Gestão de Saúde) - Escola de Saúde Pública "Dr. Jorge David Nasser", Campo Grande.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1366-1375, 2007.

CARDONA-CASTRO, N. et al. Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 3, p. 327-330, 2009.

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

CASTILLA, K. S. **Deteção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Samonella* Enteritidis utilizando a Reação em cadeia de polimerase (PCR)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASTRO, G.P.P. **Colonização e trânsito intestinal de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte no pré-abate**. 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

CATARAME, T.M.G. et al. Comparison of a real time polimerase chain reaction assay with a culture method for the detection of *Salmonella* in retail meat samples. **Journal of Food Safety**, v. 26, n. 1, p. 1-15, 2006.

CAVALCANTI, M.P.de.; LORENA, V.M.B.de.; GOMES, Y.M.de. Avanços biotecnológicos para diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***Salmonella***. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso em 12 out 2011.

CHAMBERLAIN, J.S. et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 23, p. 11141-11156, 1988.

- CHAN, K. et al. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. **Journal Bacteriology**, v. 185, p. 553-563, 2003.
- CHEN, J. et al. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 168-174, 2010.
- CHEUNG, P.Y.; KWOK, K.K.; KAM, K.M. Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test and conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 219-227, 2007.
- CHIU, C-H. et al. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 5, p. 1690-1698, 2005.
- COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n. 12, p. 4303-4308, 1996.
- CORTEZ, AL.L. et al. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 340-344, 2006.
- COSTA, F.N. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, Estado de São Paulo, em 1996. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 3, p. 97-100, 1996.
- CVE/CCD-SES - Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 515-518, 2005.
- DARINI, A.L.C. Métodos epidemiológicos de tipagens de bactérias. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 30, p. 14-19, 1994.
- DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the Interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.
- DAY, J.B; BASAVANNA, U.; SHARMA, S.K. Development of a cell culture method to isolate and enrich *Salmonella enteric* serotype Enteritidis from shell eggs for subsequent detection by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 15, n. 16, p. 5321-5327, 2009.
- DIANA, J.E.; PUI, C.F.; SON, R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. **International Food Research Journal**, v. 19, n.1, p. 51-56, 2012.
- DILMAGHANI et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from avians using Multiplex-PCR. **Veterinary Research Forum**, v. 2, n. 3, p. 157-165, 2011.

DUNKLEY, K.D. et al. Foodborn *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, p. 26-35, 2009.

DUODU, S. et al. Improved sample preparation for Real-Time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in hot-smoked salmon using filtering and immunomagnetic separation techniques. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 23-29. 2009.

EBNER, P.D.; MATHEW, A.G. Three molecular methods to identify *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104: PCR fingerprinting, multiplex PCR and rapid PFGE. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 25-29, 2001.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne. **The EFSA Journal**, v. 9, n.3, p.1-378, 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>>. Acesso 14 out 2011.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex PTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 705-713, 2008.

ESTEBAN, E. et al. Use of Ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 233-237, 1993.

EYIGOR, A.; CARLI, K.T.; UNAL, C.B. Implementation of real time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n.1, p. 37-41, 2002.

EYIGOR, A. et al. *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey. **Avian Pathology**, v. 34, n. 2, p. 101-105, 2005.

FEARNLEY, E. et al. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 219-227, 2008.

FERNANDES, S.S. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FERREIRA, A.J.P.; ITO, N.M.K.; BENEZ, S.M. Infecção natural e experimental por *Salmonella* Enteritidis em pintos. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. **Anais**. Campinas: FACTA, 1990. p.171.

FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 547-553, 2001.

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 da Polimerase. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 315-318, 2001.

FLUIT, A.C. et al. Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1342-1346, 1993.

FRATAMICO, P.M.; STROBAUGH, T.P. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 92-98, 1998.

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.

FRAUSTO, H.S.E. **Avaliação da eficiência dos métodos VIDAS® (Biolab-Mérieux) e BAX® (DuPont) na detecção de *Salmonella* spp. em carne suína, bovina e de frango.** 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FREITAS, C.G. **Adaptação da técnica de PCR múltipla para a identificação de *Salmonella* spp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium por carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.** 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, Brasília.

FREITAS, C.G. et al. PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 15-22, 2010.

FREITAS NETO, O.C.de. et al. Source of Human Non-Typhoid Salmonellosis: A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 1, p.1-11, 2010.

FRESCHI, C.R.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 363-367, 2005.

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

GALDINO, V.M.C.A. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em lotes de galinhas de postura comercial vacinadas e não vacinadas contra *Salmonella* Enteritidis.** 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

GALLEGOS-ROBLES, M.A. et al. PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. **Food Microbiology and Safety**, v. 74, n. 1, p. M37-M40, 2009.

- GANDRA, E.A. et al. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** 2006. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- GANDRA, E.A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- 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 (Suppl.), 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.
- GOUVEIA, R. **Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo.** 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 - 2007 (No. 47) to the White - Kauffmann - Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.
- HALATSI, K. et al. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. **FEMS Microbiology**, v. 259, p. 201-207, 2006.
- HASSANEIN, R. et al. Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. **Veterinary World**, v. 4, n. 1, p. 5-11, 2011.
- HEIN, I. et al. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 538-547, 2006.
- HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n.6, p. 575-584, 1996.
- HOFER, E. Considerações sobre a frequência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 72, n. 1-2, p. 63-72, 1974.
- HOFER, E.; REIS, E.M.F.dos. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.da.; REIS, E.M.F.dos. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOORFAR, J., AHRENS, P., RADSTRÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.

JONES, D.D.; LAW, R.; BEJ, A.K. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using polymerase chain reactions (PCR) and gene probes. **Journal of Food Science**, v. 58, p.1191-1197, 1993.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 127-131, 1995.

KIM, H.J. et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1653-1661, 2006.

KIM, H-J. et al. Simultaneous detection of Pathogenic *Vibrio* species using multiplex real-time PCR. **Food Control**, v. 23, p. 491-498, 2012.

KOTTWITZ, L.B.M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P.K.; THAMPURAN, N. An eight-hour PCR-based technique for detection *Salmonella* serovars in seafood. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 627-631, 2008a.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P. K.; THAMPURAN, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 221-226, 2008b.

KUMAR, S. et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 149154, 2006.

KWANG J., LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the Polymerase Chain Reaction for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 46-51, 1996.

LEAL, N.C. et al. Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife-Pernambuco, durante o triênio 1978-1980. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 1987.

LEE, S.H. et al. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium and Enteritidis in meats. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 43-51, 2009.

LEE, J.-L., LEVIN, R. E. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 2, p. 184-188. 2009.

LEITE, L.H.M.; WAISSMANN, W. Doenças transmitidas por alimentos na população idosa: Riscos e prevenção. **Revista Ciência Médica**, v. 15, n. 6, p. 525-530, 2006.

LIM, Y. et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 151-155, 2003.

LIN, A.W. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiation strains of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 870-876, 1996.

LIU, B. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 511-518, 2011.

LOPES, M. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouros de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 465-476, 2007.

LOUREIRO, E. et al. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p. 93-100, 2010.

MACIOROWSKI, K.G. et al. Polymerase Chain Reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 45-53, 2005.

MÄDE, D. et al. In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* spp. in food products. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 171-177, 2004.

MAHON, J. et al. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p.169-172, 1994.

MAKINO, S.-I. et al. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. **The Journal Veterinary Medical Science**, v. 61, p.1245-1247, 1999.

MALDONADO, A.G. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e a reação em cadeia pela polimerase -PCR**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MALKAWI, H.I.; GHARAIBEH, R. Rapid and Simultaneous identification of two *Salmonella enterica* serotypes, Enteritidis and Typhimurium from chicken and meat products by multiplex PCR. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 44-48, 2004.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48, 2003.

MALORNY, B. et al. Polymerase Chain Reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 81-95, 2009.

MARTINS, C.H.G. et al. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 19-23, 2006.

MARTINS, L.M. **Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão**. 2010. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATIAS, B.G. **Contaminação microbiana de carcaças de frangos obtidas em dois sistemas de abate e avaliação de um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp.** 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

McCARTHY, N. et al. Sensitive and Rapid Molecular Detection Assays for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 11, p. 2350-2357, 2009.

McCLELLAND, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 25, p. 852-856, 2001.

MESQUITA, R.A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

MILES, A. A., MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-748, 1938.

MOREIRA, G.N. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008a.

MOREIRA, A.N. et al. Detection of *Salmonella* Typhimurium in raw meats using in-house prepared monoclonal antibody coated magnetic beads and PCR assay of the fimA gene. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 29, p. 58-69, 2008b.

NAM, H-M. et al. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 161-171, 2005.

NASHWA, M.H.; MAHMOUD, A.H.; SAMI, S.A. Application of multiplex polymerase chain reaction (PCRm) for identification and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2343-2348, 2009.

NIGUMA, N.H. **Avaliação da necessidade de purificação de DNA para detecção de *Salmonella* spp. em oito diferentes matrizes alimentares pela reação em**

cadeia da polimerase. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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, p. 845-849, 2005.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 655-661, 2000.

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

OLIVEIRA, S.D. et al. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 217-221, 2003.

OLIVEIRA, W.P.S. **Abordagem dos aspectos biológicos, moleculares, epidemiológicos das infecções e das manifestações clínicas de *Samonella* Enteritidis.** 2006. 26f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária em Alimentos) - Universidade de Castelo Branco, Brasília.

O'REGAN, E. et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 156, p. 1-11, 2008.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477, 483, 1998.

PERRY, L. et al. Application of multiplex Polymerase Chain Reaction to the detection of pathogens in food. **The Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 15, p. 176-198, 2007.

PUI, C.F. et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, p. 337-342, 2011.

RAHN, K. et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271-279, 1992.

RAJ, K.T. et al. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for the detection of *Salmonella enterica* serovars in shrimps in 4 h. **Journal of Bacteriology Research**, v. 3, n. 3, p. 56-62, 2011.

RAMPERSAD, J. et al. Comparison of Polymerase Chain Reaction and bacterial culture for *Salmonella* detection in the Muscovy duck in Trinidad and Tobago. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, n. 4, p. 264-267, 2008.

- REZENDE, C.S.M. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.
- RIBEIRO, S.A.M. et al. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 184-188, 2009.
- RIBOT, E.M. et al. Standardization of pulsedfield gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.
- RIYAZ-UI-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 333-339, 2004.
- SALLES, R.P.R. et al. Monitoramento bacteriológico para *Salmonella* spp. em poedeira comercial na criação e produção de empresas avícolas da região metropolitana de Fortaleza, CE, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 427-432, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3.ed. 2006.
- SANTOS, L.R. et al. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 29, p. 87-92, 2001.
- SANTOS, L.R. dos. et al. RAPD/PCR and Phage typing of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry and food poisoning outbreaks. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 91-94, 2008.
- SCHRANK, I.S. et al. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 45-53, 2001.
- SHANMUGASUNDARAM, M. et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fljB*, *invA*, *rflB*, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1385-1394, 2009.
- SHELOBOLINA, E.S. et al. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranea sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2959-2965, 2004.
- SHINOHARA, N.K.S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.
- SILVA, N. da et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo, SP: Varela, 2007. 536 p.

SILVA, C.C. et al., Toxinfecção Alimentar por *Salmonella* em São Paulo/SP. **Boletim Epidemiológico Paulista**, n.1, 2004. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa11_salmo.htm>. Acesso 09 Ago 2010.

SILVA, D.S.P. et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1502-1507, 2011.

SOUMET, C. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 113-117, 1999.

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.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_por_regiao_compativo_sinan_net_sive_dda.pdf>. Acesso 12 out 2011.

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, n. 2, p. 119-127, 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, n. 5, p. 315-322, 1996.

TESSARI, E.N.C. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2557-2560, 2008.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella* entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TREVANICH, S.; TIYAPONGPATTANA, S.; MIYAMOTO, T. Application of an optimized 18-h method involving one step culturing and single primer-based PCR assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Food Control**, v. 21, p. 593-598, 2010.

TRKOV, M. et al. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v. 16, p. 393-399, 1999.

TURCOTTE, C.; WOODWARD, M. J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbria! antigen of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of General Microbiology**, v. 13, p.1477-1485, 1993.

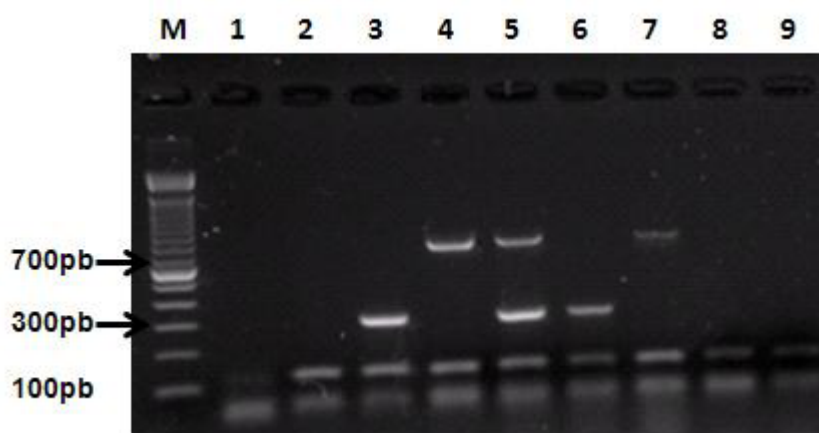
- UYTTENDAELE, M.R. et al. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 1-8, 1998.
- VAN ASTEN; VAN DIJK. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 251-259, 2005.
- VAZ, C.S.L. **Determinação da diversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul**. 2007.135f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406414, 2009.
- WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 727-736, 1997.
- WANG, Y.-P. et al. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 328-334, 2009.
- World Health Organization - WHO. **Food safety and foodborne illness**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>. Acesso 12 out 2011.
- YAN, S.S. et al. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.
- ZAHRAEI-SALEHI, T. et al. Detection and identification of *Salmonella* Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR Assay. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 131-236, 2007.

APÊNDICES

APÊNCIDE A

Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCRm.

Figura 6 – Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. 1.1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1.2) controle negativo; 1.3) controle positivo para o gênero *Salmonella*; 1.4) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076; 1.5) controle positivo de *S. Typhimurium* ATCC 14028; 1.6) controle positivo de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 1.7) cepa de *S. Enteritidis*; 1.8) cepa de *S. Typhimurium*; 1.9) *S. Bredeney* e 1.10) *S. Senftenberg*.



APÊNDICE B

Limite de detecção do ensaio PCRm com o DNA extraído pelo método de fervura.

Figura 7 – Limite de detecção da PCRm com o DNA extraído por fervura para identificação de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A.1) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); A.2) controle negativo; A.3-A.6) resultado da diluição seriada em água peptonada contendo entre 10^8 a 10^5 UFC/mL de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028.

