



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

HARISSA SILVÉRIO EL GHOZ FRAUSTO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS VIDAS<sup>®</sup>  
Biolab-Mérieux E BAX<sup>®</sup> (DuPont) NA DETECÇÃO DE  
*Salmonella* spp. EM CARNE SUINA, BOVINA E DE FRANGO**

HARISSA SILVÉRIO EL GHOZ FRAUSTO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS VIDAS<sup>®</sup>  
Biolab-Mérieux E BAX<sup>®</sup> (DuPont) NA DETECÇÃO DE  
*Salmonella* spp. EM CARNE SUINA, BOVINA E 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.

Orientador: Prof. 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)**

E37a El Ghoz Frausto, Harissa Silvério.

Avaliação da eficiência dos métodos Vidas® Biolab-Mérieux e Bax® (Dupont) na detecção de Salmonella spp. em carne suína, bovina e de frango / Harissa Silvério El Ghoz Frausto. – Londrina, 2011.

69 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 – Análise – Teses. 2. Alimentos – Contaminação – Teses. 3. Alimentos – Microbiologia – Teses. 4. Salmonela – Teste imunoenzimático – 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

HARISSA SILVÉRIO EL GHOZ FRAUSTO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS VIDAS<sup>®</sup> Biolab-  
Mérieux E BAX<sup>®</sup> (DuPont) NA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM  
CARNE SUINA, BOVINA E 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**

---

Orientador: Prof. Dra. Tereza Cristina Rocha  
Moreira de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Jane Martha Graton Mikch  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof. Dra. Vanerli Beloti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de setembro de 2011

**DEDICA**

**A Deus, minha força e minha sabedoria a qualquer momento.**

**Aos meus Pais, Eidmar e Fátima pelo amor incondicional, por estarem sempre  
ao meu lado.**

**Ao meu grande e eterno Amor Rodrigo, que está sempre comigo, me ajudando,  
me acalmando, me mimando...me fazendo Feliz.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, pela proteção (principalmente nas estradas), saúde e para iluminar meu caminho colocando em minha vida pessoas muito especiais que me fazem crescer todos os dias.

A Prof. Dra. Tereza Cristina R.M. Oliveira por ter tido bastante paciência com meus horários com minhas dúvidas, pela orientação dedicada.

A minha família, pela confiança e motivação em toda minha caminhada de estudo e de trabalho, me dando forças para não desistir nunca.

A minha mãe que me acompanhava na estrada e ficava me esperando no banquinho enquanto eu estava em aula, para que eu não dormisse na direção. Ao meu pai que por várias vezes me acompanhou.

Ao meu marido que ficou acordado por muitas madrugadas me ajudando, me apoiando, que também me acompanhou para Londrina várias vezes.

Aos amigos e colegas, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

Aos professores e colegas de Curso, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

Ao Laboratório São Camilo de Análise de Alimentos e Água que me possibilitou a realização deste trabalho e ao Dr. Sergio Piva que me encorajou a iniciar este trabalho.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Um Meio ou uma Desculpa

"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.

Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.

Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.

O sucesso é construído à noite!

Durante o dia você faz o que todos fazem.

Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial.

Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.

Não se compare à maioria, pois, infelizmente ela não é modelo de sucesso.

Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.

Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.

Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.

A realização de um sonho depende de dedicação, há muita gente que espera que o sonho se realize por mágica, mas toda mágica é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está, em verdade a ilusão

é combustível dos perdedores pois...

Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO.

Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA."

Roberto Shinyashiki

EL GHOZ FRAUSTO, Harissa Silvério. **Avaliação da eficiência dos métodos VIDAS<sup>®</sup> Biolab-Mérieux e BAX<sup>®</sup> (DuPont) na detecção de *Salmonella* spp. em carne suína, bovina e de frango.** 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

A presença de *Salmonella* spp torna os alimentos impróprios para consumo humano, sendo necessário métodos de detecção confiáveis para a salmonelose, nos laboratórios de controle de qualidade e de diagnóstico. A detecção de *Salmonella* spp. em alimentos pelo método tradicional é demorada, o que explica a abundância de sistemas automatizados e kits disponíveis comercialmente para detecção rápida deste patógeno. Muitos desses métodos alternativos são validados por organizações internacionalmente reconhecidas, mas podem apresentar resultados diferentes quando utilizados com alimentos naturalmente contaminados. Principalmente pelo fato de que a maioria das validações é realizada com amostras contaminadas artificialmente, não representando a realidade da microbiota normal das amostras. O objetivo deste trabalho é a avaliação dos métodos rápidos alternativos VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* (SLM), BAX<sup>®</sup> System e método tradicional (IN 62, MAPA) na detecção de *Salmonella* spp. em alimentos. Os métodos foram testados com amostras naturalmente contaminadas de carne de frango, suína e bovina. O método tradicional detectou 20 amostras (2,1 %) positivas para *Salmonella* spp. enquanto o método VIDAS<sup>®</sup> encontrou 87 amostras positivas (9,2 %), demonstrando uma especificidade de 93,0 %. No método BAX<sup>®</sup> foram 741 (12,7 %) resultados positivos para *Salmonella* spp. sendo que a metodologia tradicional detectou 230 (4,0 %) amostras positivas indicando 90,5 % de especificidade. Do total de 221 amostras de *Salmonella* spp. sorotipadas, o sorovar mais freqüente foi *S. Minnesota* (n=28; 15,7 %), seguida de *S. Mbandaka* (n=17; 9,5 %), *S. Schwarzengrund* (n=15; 8,4 %), *S. Saintpaul* (n=14; 7,8 %) e *S. Enteritidis* (n=13; 7,3 %). A diminuição no isolamento de *S. Enteritidis* (SE) pode ser uma consequência do Programa Nacional de Redução de Patógenos implantado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2003 e também pela vacinação para SE das matrizes de corte. Não foi possível saber com segurança se essa diminuição no isolamento de SE levou a um impacto positivo na saúde pública. É muito importante o contínuo monitoramento e a melhoria do diagnóstico em casos esporádicos e de surtos de infecção humana. Embora a freqüência do isolamento de *S. Minnesota* tenha aumentado, esse sorovar não foi associado a casos esporádicos e surtos de salmonelose ocorridos em 2009 e 2010 no Paraná. No entanto, é essencial que as autoridades sanitárias avaliem a repercussão na saúde Pública do aumento do isolamento deste sorovar em carne de frango.

**Palavras-chave:** Sorovar. VIDAS<sup>®</sup>. BAX<sup>®</sup>. Métodos imunoenzimáticos. PCR. *Salmonella* spp.

EL GHOZ FRAUSTO, Harissa Silvério. **Evaluation of the efficiency of VIDAS® Biolab-Mérieux and BAX® (DuPont) methods in the detection of Salmonella spp. in pork, beef and chicken.** 2011. 69 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011

## ABSTRACT

The presence of *Salmonella* spp makes food unfit for human consumption, requiring reliable detection methods for *Salmonella* in laboratories for quality control and diagnostics. The detection of *Salmonella* spp. in food by the traditional method is time consuming, which explains the abundance of automated systems and commercially available kits for rapid detection of this pathogen. Many of these alternative methods are validated by internationally recognized organizations, but may have different results when used with naturally contaminated food. Especially the fact that most of the validations is performed with artificially contaminated samples do not represent the reality of the normal microbiota of the samples. The objective of this work is the quick alternative methods cavalição VIDAS ® *Salmonella* (SLM), BAX ® System and the traditional method (62 IN, MAP) in the detection of *Salmonella* spp. in foods. The methods were tested with naturally contaminated samples of chicken, pork and beef. The traditional method detected 20 samples (2.1%) tested positive for *Salmonella* spp. VIDAS ® while the method found 87 positive samples (9.2%), demonstrating a specificity of 93.0%. In the BAX ® method were 741 (12.7%) tested positive for *Salmonella* spp. being that the traditional method detected 230 (4.0%) positive samples indicating 90.5% specificity. Of the total 221 samples of *Salmonella* spp. serotyped, the most frequent serovar was *S. Minnesota* (n = 28, 15.7%), followed by *S. Mbandaka* (n = 17, 9.5%), *S. Schwarzengrund* (n = 15, 8.4%), *S. Saintpaul* (n = 14, 7.8%) and *S. Enteritidis* (n = 13, 7.3%). The decrease in the isolation of *S. Enteritidis* (SE) may be a consequence of the National Pathogen Reduction implemented by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, in 2003 and also for SE by vaccination of cutting dies. It was not possible to know with certainty whether this decrease in the isolation of SE led to a positive impact on public health. It is very important to the continuous monitoring and improvement of diagnosis in sporadic cases and outbreaks of human infection. Although the frequency of isolation of *S. Minnesota* has increased, this serovar was not associated with sporadic cases and outbreaks of salmonellosis occurred in 2009 and 2010 in Paraná. However, it is essential that health officials to assess the public health impact of increased isolation of this serovar in poultry meat.

**Keywords:** Serovar. VIDAS®. BAX®. Immunoenzymatic methods. PCR. *Salmonella* spp.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> .....	16
<b>Tabela 2:</b> Métodos imunológicos de detecção de <i>Salmonella</i> spp. Em alimentos disponíveis comercialmente .....	20
<b>Tabela 3:</b> Métodos moleculares de detecção de <i>Salmonella</i> spp. Em alimentos, disponíveis comercialmente .....	21

### ARTIGO I

<b>Tabela 1:</b> Número de amostras de carne bovina, suína e de frango analisadas quanto a presença de <i>Salmonella</i> spp. No período de março de 2009 a junho de 2011 .....	28
<b>Tabela 2:</b> Resultado da detecção de <i>Salmonella</i> em amostras de carne bovina e de frango analisadas de março de 2009 a março de 2010 pelo método VIDAS e confirmadas pelo método tradicional. ....	32
<b>Tabela 3:</b> Resultado da detecção de <i>Salmonella</i> em amostras de carne bovina, suína e de frango analisadas no período de março de 2009 a março 2010 pelo método BAX e confirmadas pelo método tradicional .....	33
<b>Tabela 4:</b> Resultado da detecção de <i>Salmonella</i> em amostras de carne de frango analisadas de janeiro a junho 2011 pelo método BAX e confirmadas pelo método tradicional .....	34

### ARTIGO II

<b>Tabela 1:</b> Sorovares de <i>Salmonella</i> spp isolados de carne de frango no Paraná em 2009.....	45
<b>Tabela 2:</b> Sorovares de <i>Salmonella</i> encontrados nas regiões Centro Ocidental, Noroeste, Norte Central e Oeste do Paraná. ....	47
<b>Tabela 3:</b> Sorovares encontrados em três ou mais regiões do Paraná.....	48
<b>Tabela 4:</b> Sorovares de <i>Salmonella</i> encontrados em apenas uma região do Paraná.....	48
<b>Tabela 5:</b> Sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de swab de cama de frango e de farinha de carne e vísceras de frango em 2009 no Estado do Paraná.....	49

<b>Tabela 6:</b> Sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de material biológico humano associados a surtos e salmonelose ocorridos no Paraná de 2004 a 2010 .....	52
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1	EPIDEMIOLOGIA DA <i>SALMONELLA</i> .....	15
3.2	MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP. EM ALIMENTOS .....	19
3.2.1	VIDAS® Biolab-Mérieux .....	22
3.2.2	BAX® (DuPont Qualicon, Wilmington, EUA).....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>ARTIGO I – Avaliação dos métodos alternativos VIDAS® e BAX® na detecção de Salmonella em carne bovina, suína e de frango</b> .....		
	<b>RESUMO</b> .....	<b>25</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ARTIGO II – Sorovares de Salmonella spp. isolados de carne de frango produzida no Paraná em 2009</b> .....		
	<b>RESUMO</b> .....	<b>40</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>41</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Salmonelose é a doença de origem alimentar mais frequente no Brasil e em diversos países (ANDRIGHETO, 2006). *Salmonella* spp. engloba mais de 2500 sorovares, porém a maioria das infecções é causada por 200 sorovares (ZHAO et al., 2006), que estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os seus principais reservatórios naturais (JAY; 2005).

A transmissão de *Salmonella* de pessoa a pessoa não é comum, sendo a maior parte das infecções associadas ao consumo de alimentos contaminados. Os alimentos de origem animal, em especial produtos avícolas, continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana (SILVA & DUARTE, 2002; AMSON et al., 2006; WOO, 2005; RIBEIRO et al., 2007).

*Salmonella* spp. foi responsável por 1.122 (23,8%) dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005 (Centro de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, Ministério da Saúde do Brasil). De acordo com dados epidemiológicos obtidos no Laboratório Central de Saúde Pública Estadual (LACEN, Curitiba, PR) ocorreram, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2008 no Paraná, 286 surtos de salmonelose com 4.949 pessoas expostas, 2.122 (42,9 %) com manifestação dos sintomas da doença e 814 (16,4 %) hospitalizações. Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% foram alimentos a base de ovos, 34,8 % carnes e derivados e 20,2 % produtos classificados como alimentos variados. O sorovar prevalente foi Enteritidis, tanto nas amostras de pacientes (87,8%) quanto nas amostras de alimentos envolvidos nos surtos (80,6%) (KOTTWITZ, 2010).

Dentre os sorovares não-tifóides, SE recebeu destaque no início da década de 90, quando passou a ser registrado em diversos continentes um aumento na incidência de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este patógeno (VAZ, 2007; LAPUZ et al., 2007). No Brasil, cepas de SE isoladas de amostras humanas e não humanas (alimentos, animais, ração, água, esgoto e ambiente) começaram a ser identificadas mais frequentemente a partir de 1993 (ANDRIGHETO, 2006). No entanto, estudos recentes têm mostrado um declínio no isolamento de SE de material avícola e em carne de frango.

O Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango e o primeiro exportador desse produto. O Estado do Paraná é o maior produtor brasileiro,

seguido de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em 2010, foram produzidas 12,23 milhões de toneladas de carne de frango, com um crescimento de 11,38 % em relação a 2009. Deste total produzido, 31,0 % foi destinado à exportação. O consumo *per capita* brasileiro passou de 29,91 kg de frango, em 2000, para 44,09 kg, em 2010 (UBA, 2011). O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína, tendo produzido em 2009 aproximadamente 3,3 milhões de toneladas e um consumo per capita de 14,24 kg. O Estado do Paraná produziu, em 2009, 478,4 mil toneladas e foi o terceiro produtor nacional (ABIECS, 2011). Em 2010, a produção brasileira de carne bovina foi de 9,3 milhões de toneladas, tendo sido consumida internamente 80 % dessa produção, com 1,4 milhões de toneladas exportadas *in natura*. O consumo *per capita* foi de 37,4 kg de carne bovina (ABIEC, 2011)

A presença de *Salmonella spp.* torna qualquer alimento impróprio para consumo humano e a prevenção da contaminação de alimentos está relacionada a medidas de controle em toda a cadeia de produção. A qualidade dos produtos alimentícios industrializados depende da qualidade da matéria prima e das boas práticas de fabricação e armazenamento. Sendo assim, é necessário a padronização de métodos de detecção confiáveis para uso nos laboratórios de controle de qualidade e de diagnóstico de salmonelose.

A detecção de *Salmonella spp.* em alimentos é frequentemente realizada pelo método tradicional, também chamado método clássico. Este foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção desta bactéria mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como por exemplo, o caso de alimentos com uma microbiota competidora maior do que a população de *Salmonella spp.* e ou em alimentos nos quais as células de *Salmonella* estão em número muito reduzido e ou injuriadas por processo de preservação, tais como aplicação de calor, de congelamento ou de secagem (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; GIOMBELLI 2000).

Os métodos tradicionais de detecção de *Salmonella spp.* em alimentos pode levar de 4 a 8 dias para a liberação do resultado. A tomada de ações corretivas e preventivas, em casos de desvios de qualidade de processo, será mais eficaz quanto mais rápido os resultados de análise forem obtidos. Quanto maior o tempo transcorrido entre o início e o término da análise, maior a necessidade de armazenamento dos produtos e, conseqüentemente, o aumento de custos de produção, que são repassados ao consumidor. Sendo assim, novos métodos

analíticos e adaptações criteriosas dos métodos já existentes têm sido propostos com a finalidade de reduzir o tempo de análise.

Diferentes métodos imunológicos e moleculares foram padronizados para detecção rápida de *Salmonella spp.* como alternativa ao método tradicional (PATEL, 2000). A exigência na rapidez de resultados levou a necessidade da automação das técnicas para facilitar o processamento de grande número de amostras.

Dois dos métodos automatizados de detecção de microrganismos em alimentos muito utilizados por laboratórios brasileiros de controle de qualidade são o VIDAS<sup>®</sup> (Viteck Imumuno Diagnostic Assay System, Biolab-Mérieux, França) e o BAX (DuPont, EUA). O sistema VIDAS, empregado para detecção de *Salmonella spp.* em produtos alimentícios e amostras ambientais, é um método imunoenzimático conhecido como ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). O Sistema BAX permite detecção de diferentes patógenos em amostras de meio ambiente e de alimentos, sendo o primeiro método rápido automatizado a utilizar a técnica de PCR. O processo elimina etapas de transferência de reagentes utilizadas em outros métodos e efetivamente reduz erros do operador.

Os métodos alternativos comercializados no Brasil na forma de kits para a detecção de *Salmonella spp.* em alimentos, inclusive o VIDAS e o BAX, foram padronizados em outros países. Portanto, é essencial a validação destes métodos para a utilização em laboratórios de rotina brasileiros.

## 2 OBJETIVOS

- Comparar a eficiência dos métodos VIDAS (imunoenzimático e BAX (PCR) na detecção de *Salmonella spp.* em alimentos.
- Identificar os sorovares isolados dos alimentos no período do estudo nas diferentes regiões do Paraná.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 EPIDEMIOLOGIA DA *SALMONELLA*

De acordo com Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (GARRITY, 2005), o gênero *Salmonella* está classificada no Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales e, na Família Enterobacteriaceae (BRENNER, 1984; EDWARDS, 1999).

O gênero *Salmonella* é composto de três espécies, *Salmonella enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea* (HOLT, KRIEG & SNEATH, 1994; POPOFF & LE MINOR, 1997; JAY, 2000; POPOFF, BOCKEMÜHL & GHEESLING, 2004; TINDALL et al., 2005; SHELOBOLINA et al., 2004). A espécie *S. subterranea* foi oficialmente aceita em 18 de março de 2005 na Lista de Validação N° 102 do International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 55, 547-549. A análise da seqüência 16S rDNA desta nova espécie indicou que a amostra apresenta 96.4% de similaridade com *S. bongori* e 96.3% com *E. cloacae* (EUZÉBY, 2005; HEYNDRICKX et al., 2005; TINDALL et al., 2006).

*Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI), que por sua vez são classificadas em sorotipos ou sorovares, isto é, grupos de linhagens que compartilham antígenos de superfície reconhecidos por anticorpos específicos. Embora sorotipo e sorovar sejam freqüentemente usados, de acordo com o estabelecido pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotas, o termo sorovar é preferido em relação ao termo sorotipo (SU & CHIU, 2007).

De acordo com o esquema de Kauffmann-White, diferenças antigênicas dos antígenos O, Vi e H das espécies e subespécies de *Salmonella*, levaram à identificação de 2.541 sorovares (tabela 1). Destes, 1.504 pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica*, e colonizam o trato intestinal dos animais de sangue quente. Os sorovares das outras subespécies de *S. enterica* e da espécie *S. bongori* são associados, principalmente, a animais de sangue frio e meio ambiente (POPOFF, BOCKEMÜHL & GHEESLING, 2004; CDC, 2005).

**Tabela 1:** Nomenclatura do gênero *Salmonella*

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

**Fonte:** adaptado de SU e CHIU (2007).

\*Espécie de *Salmonella* reconhecida em 2005, porém não incorporada até o momento pelo “Center for Disease Control and Prevention” (CDC).

A transmissão de *Salmonella* spp. de pessoa a pessoa não é comum. A maioria das infecções está associada ao consumo de alimentos contaminados (TÉO & OLIVEIRA, 2005; de SOUZA, 2008) e aqueles de origem animal continuam sendo os principais responsáveis pela infecção em humanos (SILVA & DUARTE, 2002; AMSON et al., 2006), especialmente os produtos avícolas (WOO, 2005; RIBEIRO et al., 2007). Embora o gênero *Salmonella* englobe mais de 2.500 sorovares, a maioria das infecções é causada por 200 sorovares (ZHAO et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a *Salmonella* spp. está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais seu principal reservatório natural (JAY, 2005; GERMANO & GERMANO, 2008). Entre os animais, as aves (galinhas, perus, patos e gansos) são os reservatórios mais importantes, seguido de suínos, bovinos, eqüinos, animais silvestres (roedores, pássaros, anfíbios e répteis) e animais de companhia, como cães e gatos. Porém, as aves desempenham um papel de destaque pela possibilidade de serem portadores assintomáticos, excretando continuamente *Salmonella* spp. pelas fezes (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Uma ampla variedade de alimentos já foi associada à salmonelose humana (HAO et al., 1999). Carnes cruas e mal cozidas, leite cru, ovos e seus respectivos derivados, são veículos do microrganismo, sendo freqüentes também as

contaminações cruzadas de matérias primas e alimentos processados, tanto de origem animal como vegetal (GARRICK & SMITH, 1994).

A dose infectante varia com a idade e a competência dos sistemas de defesa específicos e inespecíficos do indivíduo afetado, além das características do alimento e do sorovar. As doses infectantes podem variar de 20 até  $10^6$  células por grama de alimento ou ml de água contaminada (FORSYTHE, 2002).

Alguns poucos sorovares são adaptados a determinados hospedeiros, causando síndromes específicas; sendo que *S. typhi*, *S. paratyphi A* e *S. sendai* são estritamente adaptados ao homem e causam as febres entéricas, como a febre tifóide. Os demais, denominados de ubiqüitários, por infectarem tanto o homem como os animais, são comumente referidos como não-tifóide e causam principalmente gastroenterite (POPOFF & LEMINOR, 2005; TAVECHIO, 2006; GERMANO & GERMANO, 2008).

As gastroenterites por *Salmonella* causadas por sorovares não-tifóides apresentam como sintomas clínicos dor abdominal, náusea e diarreia, que ocorrem de 8 a 72 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas desaparecem em 4 a 10 dias após o início da doença. A severidade e a duração dos sintomas dependem basicamente do sorovar de *Salmonella*, dos fatores de virulência deste patógeno, do inóculo ingerido e da susceptibilidade dos indivíduos expostos (POPOFF & LEMINOR, 2005; TAVECHIO, 2006; GERMANO & GERMANO, 2006).

No Paraná no período de 1999 a 2008, 52 municípios (13,0%) dos 399 (IBGE, 2008) que compõem o Estado notificaram surtos de salmonelose. Curitiba, município de maior população no estado (1.797.408 habitantes), apresentou a maior incidência com 90 surtos (31,5%), seguida de Francisco Beltrão (72.409 hab.) com 17 surtos (6,0%), Cascavel (285.784 hab.) com 15 (5,2%), Toledo (109.857 hab.) com 11 (3,8%), Campo Mourão (82.530 hab.) e Paranaguá (133.559 hab.) com 8 (2,8%), São José dos Pinhais (263.622 hab.) e Pato Branco (66.680 hab.) com 6 (2,1%), União da Vitória com 5 (1,7%), Vera Cruz do Oeste, Jacarezinho e Londrina com 4 surtos (1,4%). Três surtos foram registrados em Bituruna, Colombo, Contenda, Cornélio Procópio, Nova Cantu e Irati e dois surtos em Apucarana, Campo Largo, Capitão Leonidas Marques, e Enéas Marques, Guaratuba, Foz do Iguaçu e Santo Antônio da Platina. Os demais municípios notificaram um surto neste período (KOTTWITZ, 2010).

Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% (84) foram a base de ovos, 34,8% (65) carnes e derivados e 20,2% classificados como alimentos variados, tais como queijo (1%), saladas (tomate, repolho, couve, milho e ervilha) (4,8%), arroz cozido, extrato de tomate, fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofa, pavê e massas prontas (14,4%) (KOTTWITZ, 2010). Os resultados da sorotipagem das 310 cepas de *Salmonella* spp. associadas a 254 surtos, que ocorreram no Paraná entre 1999 e 2008 mostram a prevalência do sorovar Enteritidis. Das 123 cepas isoladas dos pacientes, 108 foram identificadas como SE (87,8%) e das 187 cepas isoladas de alimentos, 150 (80,6%) foram identificadas como SE (KOTTWITZ, 2010).

Porcentagens elevadas de SE foram também encontradas por Lirio et al. (1998) ao avaliarem surtos ocorridos em São Paulo, SP, entre 1992 e 1996, onde SE foi o sorovar identificado em 70,6% dos alimentos analisados. Resultados reportados por Jakabi et al. (1999) e Peresi et al. (1998) mostraram que entre 1993 e 1997, SE foi o único sorovar isolado na região noroeste do Estado de São Paulo e na capital. Em estudos epidemiológicos realizados no Mato Grosso do Sul por Viana (2002), SE foi associado a 81,4% dos surtos veiculados, principalmente, com produtos de confeitaria destacando-se o bolo confeitado. Ainda, no período de 1996 a 2003, Fernandes et al. (2006) identificaram SE em 67,4% dos isolados de fonte humana no estado de São Paulo (KOTTWITZ, 2010). A identificação de SE pelos dois principais centros de sorotipagem do país era muito baixa até o ano de 1990. Levantamento realizado entre 1970 e 1990 no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo (TAUNAY et al., 1996) mostrou que SE foi caracterizado em apenas 0,37% das 28.658 amostras de fontes humanas e 0,85% das 14.345 amostras não humanas. A continuidade dos estudos entre os anos 1991 e 1995, com as amostras do mesmo Instituto (TAVECHIO et al., 1996), mostrou uma completa reversão do quadro. Foram estudadas 5.490 amostras de *Salmonella* de origem humana e não humana. No período entre 1991 e 1995, SE passou de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% para as amostras não-humanas, com grande aumento a partir de 1993, particularmente em ovos, aves (matrizes) e amostras do meio ambiente (SILVA & DUARTE, 2002).

A vacinação com cepas homólogas de *Salmonella* spp. auxilia na redução da colonização intestinal e excreção fecal. Várias vacinas inativadas oleosas de SE têm sido licenciadas em todo o mundo. Essas vacinas previnem à transmissão transovariana, a contaminação da casca do ovo e reduzem o isolamento de SE de

aves vacinadas, inclusive de órgãos internos como o ovário (BARROW et al., 1992,1993). A vacina 9R de *S. Gallinarum* também confere proteção às aves poedeiras contra SE (BARROW et al., 1991; SILVA et al., 1991). Outras vacinas produzidas com cepas mutantes de SE ou mesmo de *S. Typhimurium* também induzem proteção de longa duração às aves vacinadas (BARROW et al., 1991; HASSAN & CURTISS III, 1997).

### 3.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA SPP.* EM ALIMENTOS

Nas ultimas décadas, vários métodos e instrumentos foram desenvolvidos como alternativas ao método tradicional, visando facilitar a operação e aumentar a precisão e rapidez na microbiologia de alimentos. Nos métodos alternativos, a simplicidade das operações, o menor número de etapas no preparo do material e, conseqüentemente, a menor manipulação, diminuem as possibilidades de contaminação e de ocorrência de erros durante a análise.

Vários métodos de detecção de *Salmonella spp.* em alimentos foram desenvolvidos e disponibilizados no comércio para uso dos laboratórios de controle de qualidade e estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2:** Métodos imunológicos de detecção de *Salmonella spp.* em alimentos disponíveis comercialmente.

MÉTODO DE DETECÇÃO	LIMITE DE DETECÇÃO	TEMPO DE ANÁLISE	VALIDAÇÃO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
ELISA VIDAS® (BioMerieux France) – até 24 testes	5-50 UFC/25g	37-49h	1; 2	93%	96%
Assurance EIA (BloControl, USA) - até 96 testes		27-35h	1	98%	96%
Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold (Raiso Diagnostics Finland) - até 96 testes	1 UFC/25g	35-45h	1; 2; 3	96,1%	100%
Tecra <i>Salmonella</i> VIA (Tecra Australia) - até 96 testes	1-5 UFC/25g	42-52h	1; 2	98-100%	95-100%
Reveal for <i>Salmonella</i> (Neogen, USA) – Individual	1-10 UFC/25g	19-23h	1	52-71%	58-78%
VIP <i>Salmonella</i> (BioControl, USA) – Individual		40-58h	1	81,9%	100%
Tecra <i>Salmonella</i> UNIQUE (Tecra Australia) - até 30 testes	1-5 UFC/25g	21-26h	1	100%	100%
Transia Card <i>Salmonella</i> (Raiso Diagnostics Finland) – Individual	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> *	40-44h	4	-	95%
Immunocapture - <i>Salmonella</i> (Raiso Diagnostics Finland) - até 8 testes	1 UFC/25g	24h	4	100%	100%
Dynabeads anti- <i>Salmonella</i> (DynaL biotech Norway) - até 96 testes	1 UFC/25g	3 dias	1	90-97,5%	100%

(EIJKELKAMP, 2008)

1: AOAC - Official Methods of AOAC International

2: AFNOR - Association Francaise de Normalisation

3: NordVal

4: Sem Validação

\* após enriquecimento

**Tabela 3:** Métodos moleculares de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, disponíveis comercialmente

MÉTODO DE DETECÇÃO	LIMITE DE DETECÇÃO	TEMPO DE ANÁLISE	VALIDAÇÃO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
Gene-Trak (Neogen, USA)- Individual	1-5UFC/25g	46-51h	1	99,20%	98,5%-99,75%
GeneQuence (Neogen, USA) - até 96 testes	1-5UFC/25g	26-29h	1	98,90%	99,70%
BAX <sup>®</sup> (DuPont Qualicon, USA) - até 96 testes	10 <sup>4</sup> UFC/mL*	48h	1	98%	99,70%
iQ-Check PCR, Bio-Rad, USA) - até 96 testes	1-50 UFC/25g	26-47h	2/3	87-100%	95-99,6%
Roch Diagnostic LightCycler <i>Salmonella</i> detection kit - até 30 testes	1-10UFC/25g	18-20h	1/3	97,0-99,7%	100%
TaqMan <i>Salmonella</i> enteric (Applied Biosystems, USA) - até 96 testes	1 UFC/25g	20h	1/2	100%	100%

(EIJKELKAMP, 2008)

- 1: AOAC - Official Methods of AOAC International
- 2: AFNOR - Association Francaise de Normalisation\
- 3: NordVal
- 4: Sem Validação
- \* Após enriquecimento

Dois desses métodos, utilizados internacionalmente, são adotados em diversos laboratórios de controle de qualidade no Brasil e serão avaliados neste trabalho.

### 3.2.1 VIDAS<sup>®</sup> Biolab-Mérieux

O método VIDAS<sup>®</sup> utiliza uma mistura de anticorpos monoclonais específicos para antígenos somáticos e flagelares móveis e imóveis, possibilitando a detecção de *Salmonella* spp. O método é imunoenzimático, e utiliza anticorpos monoclonais específicos marcados com a enzima fosfatase alcalina. O substrato para enzima é o metil umbeliferil fosfato que quando hidrolisado produz um composto fluorescente detectável pelo equipamento.

O cone de utilização serve tanto de fase sólida, como no sistema de pipetagem para o teste. O interior do cone está revestido com anticorpos anti-*Salmonella* spp. adsorvidos em sua superfície. Os outros reagentes se encontram prontos para utilização no barrete. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no aparelho.

Uma alíquota do caldo de enriquecimento seletivo é colocada no barrete, e a amostra é submetida a um ciclo de afluxo e refluxo, através do cone, cuja duração foi especificamente calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes na amostra analisada vão fixar-se aos anticorpos monoclonais anti-*Salmonella* spp. adsorvidos no interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos livres e em seguida, o conjugado preparado contendo os anticorpos marcados com fosfatase alcalina será acrescentado aos cones. Se a amostra estiver contaminada com *Salmonella* spp. o conjugado irá se ligar. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato metil-umbeliferil fosfato é adicionado ao cone e misturado; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato formando o produto 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm (MANUAL DO KIT VIDAS<sup>®</sup> Biolab-Mérieux, 2010).

Os resultados são obtidos após aproximadamente 48h incluído o pré-enriquecimento, o enriquecimento seletivo, 15 minutos de inativação das bactérias

pelo calor e 45 minutos necessários para o processo de detecção no aparelho. O método inclui enriquecimento das amostras com finalidade de aumentar a sensibilidade e a segurança de que possíveis células injuriadas sejam recuperadas.

### 3.2.2 BAX<sup>®</sup> (DuPont Qualicon, Wilmington, EUA)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método rápido de uma técnica alternativa específica e sensível para detecção de *Salmonella*, fornecendo resultados com precisão em torno de 24 horas (BAILEY & COX, 1996). Entretanto, a transferência para laboratórios de rotina de métodos PCR tradicional padronizados em laboratório de pesquisa tem sido lenta. Este fato pode ser explicado, em parte, pela utilização de gel de eletroforese para a detecção dos produtos amplificados, que limitam o número de amostras que podem ser testadas, além da interpretação dos resultados do gel ser subjetiva.

O Método BAX<sup>®</sup> (DuPont Qualicon, Wilmington, EUA) permite a detecção de diferentes patógenos em amostras de meio ambiente e de alimentos. O BAX<sup>®</sup> foi o primeiro método rápido automatizado a utilizar a metodologia da PCR, que permite a análise rápida e a interpretação simples dos resultados. Este novo método simplifica o PCR, pois fornece os iniciadores específicos: a enzima polimerase, os nucleotídeos e o controle positivo combinados em um único tablete acondicionado em microtubo. O processo elimina etapas de transferência de reagentes utilizadas em outros métodos e efetivamente reduz erros do operador. O método BAX<sup>®</sup> elimina a necessidade da realização da eletroforese em gel para a avaliação dos produtos amplificados na PCR e a foto documentação. O termociclador está ligado a um sistema de detecção automatizada que elimina a possibilidade de contaminação cruzada, pois para a análise não existe a necessidade da abertura dos microtubos contendo o material amplificado.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão estão apresentados nos artigos I e II, que serão submetidos para publicação em revistas científicas. Nos trabalhos também estão apresentados material e métodos utilizados para o desenvolvimento dos trabalhos.

## ARTIGO I

### AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS VIDAS<sup>®</sup> E BAX<sup>®</sup> NA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* EM CARNE BOVINA, SUÍNA E DE FRANGO.

Harissa Silvério El Ghaz Frausto, Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

#### RESUMO

A detecção de *Salmonella* spp. em alimentos pelo método tradicional é demorada, o que explica a abundância de sistemas automatizados e kits disponíveis comercialmente para detecção rápida deste patógeno. Muitos desses métodos alternativos são validados por organizações internacionalmente reconhecidas, mas podem apresentar resultados diferentes quando utilizados com alimentos naturalmente contaminados, principalmente, pelo fato de que a maioria das validações é realizada com amostras contaminadas artificialmente, não representando a realidade da microbiota normal das amostras. O objetivo deste trabalho foi a comparação dos métodos alternativos VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* (SLM), BAX<sup>®</sup> System e método tradicional (IN 62, MAPA) na detecção de *Salmonella* spp. em alimentos. Os métodos foram testados com amostras naturalmente contaminadas de carne de frango, suína e bovina. O método tradicional detectou 20 amostras (2,1 %) positivas para *Salmonella* spp. enquanto o método VIDAS<sup>®</sup> encontrou 87 amostras positivas (9,2 %), demonstrando uma especificidade de 93,0 %. No método BAX<sup>®</sup> foram 741 (12,7 %) resultados positivos para *Salmonella* spp. sendo que a metodologia tradicional detectou 230 (4,0 %) amostras positivas indicando 90,5 % de especificidade. Os dois métodos são adequados e viáveis para a rotina laboratorial, principalmente, de laboratórios que analisam um grande número de amostras de alimentos diariamente. No entanto, é importante ressaltar que os métodos continuam sendo de triagem, exigindo sempre confirmação da presença de *Salmonella* spp. pelo método tradicional.

**Palavras-chave:** Sorovar VIDAS; BAX; Métodos imunoenzimáticos, PCR, *Salmonella* spp.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é o patógeno que causa com mais freqüência doenças transmitidas por alimentos em diversos países (ANDRIGHETO, 2006), sendo o homem e os animais os seus principais reservatórios naturais (JAY, 2005). A transmissão de *Salmonella* spp. de pessoa a pessoa não é comum. A maioria das infecções está associada ao consumo de alimentos contaminados (TÉO & OLIVEIRA, 2005; SOUZA, 2008) e aqueles de origem animal continuam sendo os principais responsáveis pela infecção de *Salmonella* spp. em humanos (SILVA & DUARTE, 2002; AMSON et al., 2006), especialmente os produtos avícolas (WOO, 2005; RIBEIRO ET AL., 2007).

A detecção de *Salmonella* spp. em alimentos é frequentemente realizada pelo método tradicional, também chamado método clássico. Este foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção desta bactéria mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como por exemplo, o caso de alimentos com uma microbiota competidora maior do que a população de *Salmonella* spp. e ou em alimentos nos quais as células de *Salmonella* estão em número muito reduzido e ou injuriadas por processo de preservação, tais como aplicação de calor, de congelamento ou de secagem (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; GIOMBELLI 2000).

O método tradicional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos pode levar de 4 a 8 dias e envolvem cinco etapas seqüenciais: a) pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável; b) enriquecimento seletivo, no qual a amostra é colocada em caldo de cultivo contendo reagentes inibitórios que permitem a multiplicação de *Salmonella* spp., enquanto restringem a proliferação da maioria das outras bactérias; c) semeadura em meios sólidos seletivos diferenciais que restringem a multiplicação de outras bactérias que não *Salmonella*; d) testes bioquímicos, que fornecem dados fenotípicos da cepa isolada; e) sorotipagem para caracterização antigênica, que é o passo definitivo para a identificação específica da cepa isolada (BAILEY, et al., 1991).

A tomada de ações corretivas e preventivas, em casos de desvios de qualidade de processo, será mais eficaz quanto mais rápido os resultados microbiológicos forem obtidos. Quanto maior o tempo transcorrido entre o início e o

término da análise microbiológica, maior a necessidade de armazenamento dos produtos e, conseqüentemente, o aumento de custos de produção, que são repassados ao consumidor. Sendo assim novos métodos analíticos e adaptações criteriosas dos métodos já existentes têm sido propostos com a finalidade de reduzir o tempo de análise.

Diferentes métodos imunológicos e moleculares foram padronizados para detecção rápida de *Salmonella* spp. como alternativa ao método tradicional (PATEL, 2000). A exigência na rapidez de resultados levou a necessidade da automação das técnicas para facilitar o processamento de grande número de amostras.

Dois dos métodos automatizados de detecção de microrganismos em alimentos muito utilizados por laboratórios brasileiros de controle de qualidade são o VIDAS<sup>®</sup> e o BAX<sup>®</sup> patenteados pelo laboratório Biolab-Biomerieux (França) e DuPont (EUA), respectivamente. O método VIDAS<sup>®</sup> empregado para detecção de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios e amostras ambientais é um método imunoenzimático conhecido como ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). O método BAX<sup>®</sup> permite detecção de diferentes patógenos em amostras de meio ambiente e de alimentos, sendo o primeiro método rápido automatizado a utilizar a técnica de PCR. O processo elimina etapas de transferência de reagentes utilizada em outros métodos e efetivamente reduz erros do operador.

Os diferentes métodos alternativos comercializados no Brasil na forma de kits para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, inclusive o VIDAS<sup>®</sup> e o BAX<sup>®</sup> foram padronizados em outros países. Portanto, é essencial a validação destes métodos para a utilização em laboratórios de rotina brasileiros.

Dado o exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência dos métodos VIDAS<sup>®</sup> (imunoenzimático) e BAX<sup>®</sup> (PCR) na detecção de *Salmonella* spp. em alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

No período de março de 2009 a junho de 2011 foram analisadas quanto a presença de *Salmonella* spp. 9.214 amostras de carne bovina (n=754), suína (n=173) e de frango (n=8.287), conforme tabela 1.

As amostras foram coletadas de várias regiões do estado do Paraná e transportadas em caixas isotérmicas mantendo a temperatura entre 2 e 8 °C. As amostras chegaram ao laboratório no máximo 24 horas após a coleta e as análises foram realizadas no mesmo dia do recebimento.

Neste período, 947 amostras foram analisadas pelo método VIDAS<sup>®</sup> (Bio Merieux) e 8.267 amostras pelo método BAX<sup>®</sup> (Dupont-Qualicom).

Todas as amostras positivas para *Salmonella* pelo método VIDAS<sup>®</sup> ou BAX<sup>®</sup> foram submetidas a confirmação utilizando o método tradicional de cultura.

**Tabela 1:** Número de amostras de carne bovina, suína e de frango analisadas quanto a presença de *Salmonella* spp. no período de março de 2009 a junho de 2011.

Período de Análise	Tipo de carne	Total de amostras analisadas pelo método VIDAS	Total de amostras analisadas pelo método BAX	Total de amostras analisadas
Março de 2009 a Março de 2010	bovina	273	481	754
	suína	-	173	173
	frango	674	5.171	5.845
Janeiro a Junho de 2011	frango	-	2.442	2.442
TOTAL		947	8.267	9.214

### Método VIDAS<sup>®</sup>

A detecção de *Salmonella* pelo método VIDAS<sup>®</sup> foi realizada seguindo as instruções do fabricante, conforme resumido a seguir. O pré-enriquecimento das amostras foi realizado após a homogeneização de 25g das amostras de carne

bovina, suína e de frango em 225mL de água peptonada 1% e incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por no mínimo 16 h e não mais que 20h. Alíquota de 1 mL do caldo de pré-enriquecimento foi inoculado em 10 mL de caldo *Salmonella* Xpress 2 (SX2) (BioMerieux). Após 24 a 26 h de incubação a  $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 3mL do caldo SX2 foi transferido para tubos estéreis e colocado em banho-maria a  $95 - 100^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida, alíquotas de 500 $\mu\text{L}$  foram inoculadas nos barretes do aparelho VIDAS<sup>®</sup> e analisadas seguindo-se a instrução do fabricante. Após aproximadamente 45 minutos, a análise foi considerada concluída se o resultado no método VIDAS<sup>®</sup> foi negativa. A confirmação de presença de *Salmonella* nas amostras positivas no método VIDAS<sup>®</sup> foi realizada empregando a metodologia tradicional descrita abaixo.

### **Método BAX**

A detecção de *Salmonella* pelo método BAX<sup>®</sup> foi realizada seguindo as instruções do fabricante, conforme resumido a seguir. O pré-enriquecimento das amostras foi realizado de acordo com o descrito acima para o método VIDAS. Alíquotas de 5 $\mu\text{L}$  do pré-enriquecimento das amostras foram inoculadas em 200  $\mu\text{L}$  do reagente de lise (protease). Estas amostras foram aquecidas por 20 min a  $37^\circ\text{C}$ , para a lise celular e digestão de proteínas e, em seguida, por 10 min a  $95^\circ\text{C}$  para a inativação da protease. As amostras foram resfriadas em bloco de gelo por 5 min. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  das amostras lisadas foram transferidas para tubos de PCR, e iniciado o processo de amplificação no aparelho BAX. Após aproximadamente três horas e 40 minutos, a análise foi considerada concluída se o resultado no método BAX<sup>®</sup> foi negativo. A confirmação de presença de *Salmonella* nas amostras positivas no método BAX<sup>®</sup> foi realizada empregando a metodologia tradicional descrita abaixo.

### **Método Tradicional**

A pesquisa de *Salmonella* spp. pelo método tradicional foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas em Alimentos (ICMSF, 1982) e adaptada segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL,

2003).

Alíquotas de 0,1 e 1mL do pré-enriquecimento das amostras positivas nos métodos VIDAS<sup>®</sup> e BAX<sup>®</sup> foram inoculadas em 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid) (RV) e 10 mL de Selenito Cistina (Difco), respectivamente. O Caldo RV e o Caldo SC foram incubados a 42°C por 24h em banho maria. O isolamento foi realizado em Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose – BPLS (OXOID) e Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green – MLCB (OXOID), incubados a 36°C por 24 horas. A identificação bioquímica preliminar de colônias típicas de *Salmonella* foi realizada empregando ágar tríplice açúcar ferro – TSI (Oxoid), lisina ferro LIA (Oxoid), uréia (Oxoid) e SIM (Oxoid), incubados a 37°C por 24 horas.

A confirmação do gênero *Salmonella* foi realizada com anti-soros polivalentes somático (O) (Probac) e flagelar (H) (Probac).

O sistema de identificação bioquímica API 20E (BioMerieux) foi empregado para confirmação bioquímica dos isolados de *Salmonella* spp. e da microbiota contaminante isolada nas amostras positivas nos métodos VIDAS<sup>®</sup> e BAX, mas não confirmadas pelo método tradicional.

### **Cálculo da especificidade**

O cálculo da especificidade foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\frac{VN}{VN + FP}$$

VN = número de amostras negativas

FP = número de amostras falso positivas

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método tradicional de cultura para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos é demorado e trabalhoso. Métodos alternativos disponíveis comercialmente estão sendo utilizados com a finalidade de reduzir o tempo de análise e agilizar o controle de qualidade de alimentos. No entanto, esses métodos necessitam de validação para serem utilizados com segurança.

No presente trabalho foram analisadas amostras de carne de frango, suína e bovina pelos métodos alternativos VIDAS<sup>®</sup> e BAX. Antes do início do trabalho, foram realizadas de abril e maio de 2006 análises de diferentes alimentos (n=1.000) para a detecção de *Salmonella*, empregando o método tradicional de cultura e em paralelo o método VIDAS. O mesmo foi realizado com o método BAX<sup>®</sup> (n=1.200) no período de maio e junho de 2009. Nenhum resultado falso negativo foi obtido com os referidos métodos, aceitando-se que esses dois métodos apresentam sensibilidade de 100 %. Yeh et al. (2002) avaliaram amostras de carcaça de suíno pelo método VIDAS<sup>®</sup> e também não obtiveram resultados falso negativos. O mesmo foi encontrado por Mata (2009) quando analisaram amostras de queijo Minas frescal artesanal pelo método VIDAS<sup>®</sup> e BAX.

Amostras de alimentos positivas para *Salmonella* no VIDAS<sup>®</sup> e no BAX<sup>®</sup> só são consideradas contaminadas por essa bactéria patogênica se houver isolamento pelo método tradicional. Se *Salmonella* não for isolada na cultura a amostra é considerada não contaminada e o resultado obtido é considerado como um falso positivo.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos com as amostras de carne de frango e bovina analisadas pelo método VIDAS. Das 947 amostras analisadas 87 (9,2 %) foram positivas, porém *Salmonella* spp. foi isolada pelo método tradicional de cultura em apenas 20 amostras, com uma especificidade de 77,0 %. A especificidade para carne de frango foi 76,2 % (n=64) e para carne bovina 60,0 % (n=3). A percentagem de falso positivo foi de 1,1 (n=3) para carne bovina e 9,5 (n=64) para carne de frango.

**Tabela 2:** Resultado da detecção de *Salmonella* em amostras de carne bovina e de frango analisadas de março de 2009 a março de 2010 pelo método VIDAS<sup>®</sup> e confirmadas pelo método tradicional.

	Tipo de carne analisada		
	Bovina	Frango	Total
Total de amostras analisadas	273	674	947
Total de amostras positivas pelo VIDAS <sup>®</sup> (%)	5 (1,8)	82 (12,2)	87 (9,2)
Total de amostras confirmadas pelo método tradicional (%)	2 (0,7)	18 (2,7)	20 (2,1)
Percentagem de falso positivo	1,1 (n=3)	9,5 (n=64)	7,1 (n=67)
Especificidade	98,0 %	91,2 %	93,0 %

Os resultados obtidos no presente trabalho com o método VIDAS<sup>®</sup> são divergentes dos encontrados por outros autores, que obtiveram percentagens de falso positivos menores. Mata (2009) obteve 3,17 % de resultados falso positivos ao analisar 63 amostras de queijo Minas artesanal pelo método VIDAS<sup>®</sup> -SLM. Os resultados falso-positivos podem ter ocorrido em função da especificidade do anticorpo utilizado que pode apresentar reações cruzadas com outros antígenos correlacionados. WALKER et al. (2001) analisando amostras de leite, e DE MÉDICI et al (1998) amostras de carne de frango, relataram altas correlações entre os resultados do VIDAS<sup>®</sup> e o método tradicional. Os autores destacaram as vantagens do sistema VIDAS<sup>®</sup> frente à cultura, como maior rapidez, facilidade e praticidade. Louguercio et al. (2002) encontraram 1,82 % de resultados falso-positivos para *Salmonella* sp. após análise de 110 amostras de lingüiça suína pelo método tradicional e ELISA. Os autores sugeriram que os dois falsos positivos observados com a técnica ELISA ocorreram, possivelmente, pela alta contaminação observada no plaqueamento em meio seletivo-diferencial, provavelmente com *Proteus* spp.

A especificidade obtida no presente trabalho foi semelhante a obtida por outros autores. Yeh et al. (2002) avaliaram 257 esponjas de amostras de carcaças de porco quanto à presença de *Salmonella* sp. pelo método VIDAS<sup>®</sup> -SLM e pelo método tradicional. A especificidade do método VIDAS<sup>®</sup> -SLM foi de 100 %. Vieira-Pinto et al. (2007) avaliaram comparativamente o método VIDAS<sup>®</sup> -SLM com o método tradicional ISO 6579 para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de carcaças de suínos e encontraram 93,0 % de especificidade.

Na tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos com as amostras de carne bovina, suína e de frango, analisadas pelo método BAX<sup>®</sup> no período de março de 2009 a março de 2010. No método BAX<sup>®</sup> foram analisados 5.825 amostras, sendo que 12 (63,2 %), 27 (90,0 %) e 198 (47,0 %) deram especificidade para carne bovina, suína e de frango, respectivamente. A percentagem de falso positivo foi 2,5 (n=12), 15,0 (n=27) e 3,8 (n=198) para carne bovina, suína e de frango, respectivamente.

Na tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos com amostras de carne de frango, analisadas pelo método BAX<sup>®</sup> no período de janeiro a junho de 2011. No método BAX<sup>®</sup> foram analisados 2.442 amostras, sendo que 247 (10,0 %) deram falso positivo e a especificidade foi de 58,8 %.

**Tabela 3:** Resultado da detecção de *Salmonella* em amostras de carne bovina, suína e de frango analisadas no período de março de 2009 a março de 2010 pelo método BAX<sup>®</sup> e confirmadas pelo método tradicional.

	Tipo de carne analisada			
	Bovina	Suína	Frango	Total
Total de amostras analisadas	481	173	5.171	5.825
Total de amostras positivas pelo BAX <sup>®</sup> (%)	19 (4,0)	30 (17,3)	422 (8,2)	741 (12,7)
Total de amostras confirmadas no método tradicional	7 (1,5)	3 (1,7)	224 (4,3)	230 (4,0)
Percentagem de falso positivo	2,5 (n=12)	15,0 (n=27)	3,8 (n=198)	8,8 (n=511)
Especificidade	97,0 %	86,0 %	96,0 %	91,0 %

**Tabela 4:** Resultado da detecção de *Salmonella* em amostras de carne de frango analisadas de janeiro a junho 2011 pelo método BAX<sup>®</sup> e confirmadas pelo método tradicional.

	Carne de frango
Total de amostras analisadas	2.442
Total de amostras positivas pelo BAX <sup>®</sup> (%)	423 (17,3)
Total de amostras confirmadas pelo método tradicional (%)	176 (7,2)
Percentagem de falso positivo	10,0 (n=247)
Especificidade	90,0 %

Os resultados obtidos com o BAX<sup>®</sup> foram semelhantes aos obtidos por Mata (2009), que não encontrou divergência entre o método tradicional e BAX<sup>®</sup> após análise de 63 amostras de queijo minas frescal artesanal.

Outros autores avaliaram outros métodos baseados no ELISA e PCR, e encontraram resultados divergentes dos obtidos no presente trabalho, principalmente, em relação à sensibilidade. DICKEL et al., (2005) observaram falsos negativos com a técnica de ELISA e PCR quando comparados com método tradicional. *Salmonella* spp. foi isolada em 26% das amostras de frango analisadas pelo método tradicional, em 17,8 % pelo ELISA e 12,2 % pela PCR. Os autores destacaram a possibilidade de resultados falso positivos na técnica de ELISA pela ocorrência de reações cruzadas com outras enterobactérias. WHYTE et al. (2002) observaram que quando os métodos tradicional e PCR foram combinados a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango passou para 23%. Quando os métodos tradicional e PCR foram realizados individualmente a detecção foi de 16,0 e 19,0 %, respectivamente.

Segundo Mattick et al. (2002) um dos principais problemas no isolamento de *Salmonella* é o pequeno número dessa bactéria, em relação à quantidade de outras bactérias contaminantes. No presente trabalho um total de 48 amostras de alimentos positivas para *Salmonella* pelo método VIDAS<sup>®</sup> (n=7) ou BAX<sup>®</sup> (n=41), sem a confirmação dessa bactéria patogênica pelo método tradicional, estavam contaminadas com outros bacilos Gram negativos, que foram identificados pelo API 20E (Bio Merieux). Além de *Serratia* spp., as seguintes espécies foram identificadas: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *E. sakazakii*, *Proteus mirabilis*,

*P. vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *C. younge*, *C. braaki*, *C. casei*, *Raultella ornithionolytica*, *R. terrigena*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. luteola*, *P. fluorescens*, *Chromobacterium violaceum*, *Pasteurella pneumotropico*, *Photobacterium damsela*. Após a análise dos resultados obtidos, observou-se que 80,5 % das bactérias identificadas pertenciam ao gênero *Enterobacter* (n=70; 40,2 %), *Serratia* (n=45; 25,9 %) e *Citrobacter* (n=32; 18,4 %). Louguercio et al. (2002) sugeriram que os resultados falsos positivos observados com a técnica de ELISA, durante análise de carne suína, ocorreram, possivelmente, pela alta contaminação com *Proteus* spp. observada no plaqueamento em meio seletivo-diferencial.

Apesar da percentagem de falso positivo ter sido mais alta para a carne de frango do que a observada por outros autores, os métodos VIDAS<sup>®</sup> e BAX<sup>®</sup> são ótimas alternativas para laboratórios de rotina que analisam número muito grande de amostras. Do total de 53.773 amostras de alimentos analisadas em 2009, 2010 e até abril de 2011, 75,0 % (n=4.329) foram analisadas somente pelo método tradicional de cultura e, deste total, 51,8 % (n=20.879) foram amostras de carne bovina, suína e de frango cruas. Uma alta percentagem dos alimentos, e principalmente de carnes cruas, está contaminada com *Proteus* spp e ou *Citrobacter freundii*, que apresentam características coloniais semelhantes às colônias de *Salmonella* spp. nos meios seletivos diferenciais utilizados na rotina. Devido a esse fato, aproximadamente 100 % das amostras de carnes cruas analisadas no período referido acima exigiram a identificação bioquímica das colônias, o que aumenta consideravelmente o tempo e o custo da análise (dados não apresentados). Assim sendo, o uso de maneira criteriosa e com segurança de métodos alternativos, como VIDAS<sup>®</sup> ou BAX, em laboratórios com um volume muito grande de análise é essencial.

A possível explicação para a maior percentagem de falso positivo encontrada neste trabalho pode ser o número grande de amostras de carne de frango analisadas, que normalmente apresenta uma microbiota contaminante maior que a encontrada em outros tipos de carne.

A maioria dos trabalhos publicados com métodos alternativos de detecção de *Salmonella* spp. analisou um número de amostras de alimentos muito menor que a avaliada no presente trabalho e foi realizada em outros países. Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram uma avaliação adequada dos métodos VIDAS<sup>®</sup> e BAX, que são métodos alternativos muito utilizados nos laboratórios brasileiros de rotina.

## CONCLUSÃO

Os métodos BAX<sup>®</sup> e VIDAS<sup>®</sup> para a pesquisa de *Salmonella* spp. apresentaram percentagens de falso positivos superiores a 7,1 % para amostras de carne bovina, suína e de frango analisadas. Os dois métodos são adequados e viáveis para a rotina laboratorial, principalmente, de laboratórios que analisam um grande número de amostras de alimentos diariamente. Estes métodos por apresentarem percentagem de resultados falso negativos muito baixa, reduzem o tempo de obtenção de resultados positivos presuntivos. No entanto, é importante ressaltar que os métodos continuam sendo de triagem, exigindo sempre confirmação da presença de *Salmonella* spp. pelo método tradicional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por Alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ver. Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n.6, p.1139-1145, 2006.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isolados em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** São Paulo. 2006. 99p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] – Universidade de São Paulo. SP.

BAILEY, J.S., COX, N.A., BLANKENSHIP, L.C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring *Salmonella* e from processed broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 354, 1991;

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62 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, 2003a.

DE MEDICI, E., D., Pezzotti, G., MARFOGLIA, C., CACIOLO, D., FOSHI, G., OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology** n.45, p 205-210, 1998.

De SOUZA, R.B. **Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de Cepas de *Salmonella* epidêmicas e de origem avícolas isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil.** Londrina 2008. 86p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F.M.; DUARTE, L.F. Microbiologia convencional, ELISA, e PCR para para Detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-

automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v.19, n. 133, p. 79-85, 2005.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: Um problema /técnico bastante complexo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.68/69, v.14, jan/fev. p.58-61,2000.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods – **Microbiología de los alimentos: Características de los patógenos microbianos, vol. 5, p. 606. Editorial Acribia, S.A. 1996;**

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York. International Thomson Publishing, 5th ed., p 507 – 526, 2005;

LOUGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M. ELISA INDRETO na detecção de *Salmonella* spp.. em lingüiça suína. **Ciênc. Rural., Santa Maria, v.32, n.6, p.1057-1062, 2002.**

MATA, M. S. C., **Comparação de métodos para Pesquisa de *Salmonella* sp. E *Listeria* sp. e Avaliação microbiana e Físico-Química em Queijo Minas Artesanal.** Dissertação [Magister Scientiae] Universidade Federal de Viçosa. 2009

PATEL, P. D. (2000) ***Salmonella* detection by enzyme immunoassays**. In *Encyclopedia of Food Microbiology* ed. Robinson, R. K.; BATT, C. A. and Patel, P. D. pp. 1956-1964. London: Academic Press.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P., *Salmonella* spp.. . in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.296-299, 2007.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.4, n.2, p. 85-100, 2002.

TÉO, C.R.P.A., OLIVEIRA, T.C.R.M., *Salmonella* spp.: The egg as vehicle of transmission and the implications of resistance for public health. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n.2, p.195-210, 2005.

VIEIRA-PINTO, M.; OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F.; MARTINS, C. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS-SLM system and ISSO 6579 traditional method. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.1388-1393, 2007.

VON RÜCKERT, D. A. S. Comparação dos métodos microbiológico tradicional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

WALKER, R. L., KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS<sup>®</sup> enzyme-linked fluorescent immunoassay using MOORE swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, n.67, p.123-129, 2001.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COLLINS, J.D. and GORMELEY, E. (2002) **The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry.** *Veterinary Microbiology* 89, 53-60.

WOO, Y.K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis. **Journal of Microbiology**, 43:424-429, 2005.

YEH, K.; TSAI, C. E.; CHEN, S. P.; LIAO, C. W. Comparison between VIDAS<sup>®</sup> automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 10, p. 1656-1659, 2002.

## ARTIGO II

### **Sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carne de frango produzida no Paraná em 2009**

Harissa Silvério El Ghoz Frausto, Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

#### **RESUMO**

*Salmonella* spp. é o patógeno que causa com mais frequência doenças transmitidas por alimentos em diversos países. A transmissão de *Salmonella* spp. de pessoa a pessoa não é comum. A maioria das infecções está associada ao consumo de alimentos contaminados e os alimentos de origem animal, em especial produtos avícolas, continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana. O objetivo deste trabalho foi identificar os sorovares de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de frango produzidas no Paraná de março de 2009 a março de 2010. Do total de 221 amostras de *Salmonella* spp. sorotipadas, o sorovar mais freqüente foi S. Minnesota (n=28; 15,7 %), seguida de S. Mbandaka (n=17; 9,5 %), S. Schwarzengrund (n=15; 8,4 %), S. Saintpaul (n=14; 7,8 %) e S. Enteritidis (n=13; 7,3 %). A diminuição no isolamento de S. Enteritidis (SE) pode ser uma consequência do Programa Nacional de Redução de Patógenos implantado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2003 e também pela vacinação para SE das matrizes de corte. Não foi possível saber com segurança se essa diminuição no isolamento de SE levou a um impacto positivo na saúde pública. É muito importante o contínuo monitoramento e a melhoria do diagnóstico em casos esporádicos e de surtos de infecção humana. Embora a freqüência do isolamento de S. Minnesota tenha aumentado, esse sorovar não foi associado a casos esporádicos e surtos de salmonelose ocorridos em 2009 e 2010 no Paraná. No entanto, é essencial que as autoridades sanitárias avaliem a repercussão na saúde Pública do aumento do isolamento deste sorovar em carne de frango.

**Palavras-Chaves:** *Salmonella* spp., sorovares, método tradicional de cultura, identificação bioquímica.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é a causa mais importante de infecção bacteriana de origem alimentar no Brasil. A presença de *Salmonella* spp. torna qualquer alimento impróprio para consumo humano e a prevenção da contaminação de alimentos está relacionada a medidas de controle em toda a cadeia de produção. A qualidade dos produtos alimentícios industrializados depende da qualidade da matéria prima e das boas práticas de fabricação e armazenamento.

Dentre os sorovares não-tifóides, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis (SE) recebeu destaque no início da década de 90, quando passou a ser registrado um aumento na incidência de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este patógeno (VAZ, 2007; LAPUZ et al., 2007). No Brasil, cepas de SE isoladas de amostras humanas e não humanas (alimentos, animais, ração, água, esgoto e ambiente) começaram a ser identificadas mais frequentemente a partir de 1993 (ANDRIGHETO, 2006).

*Salmonella* spp. foi responsável por 1.122 (23,8%) dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005. Um total de 3.554 amostras de *Salmonella* foram isoladas de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil, no período de 2000 a 2005, sendo SE o mais freqüente (67,4%), seguido de Typhimurium (5,2%), *S. enterica* subsp. *enterica* O:4,5:1,2: i- (5,1%), Typhi (4,0%), Dublin (2,5%), Infantis (2,3%), Agona (1,4%), Panama (1,0%) e outros 60 sorovares (8,8%) (Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil).

De acordo com dados epidemiológicos obtidos no Laboratório Central de Saúde Pública Estadual (LACEN, Curitiba, PR) ocorreram, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2008, 286 surtos de salmonelose com 4.949 pessoas expostas, 2.122 (42,9 %) com manifestação dos sintomas da doença e 814 (16,4 %) hospitalizações. Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% foram alimentos a base de ovos, 34,8 % carnes e derivados e 20,2 % produtos classificados como alimentos variados. O sorovar prevalente foi Enteritidis, tanto nas amostras de pacientes (87,8%) quanto nas amostras de alimentos envolvidos nos surtos (80,6%) (KOTTWITZ, 2010).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango e o primeiro exportador desse produto. O Estado do Paraná é o maior produtor brasileiro, seguido de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em 2010, foram produzidas 12,23 milhões de toneladas de carne de frango, com um crescimento de 11,38 % em

relação a 2009. Deste total produzido, 31,0 % foi destinado à exportação. O consumo *per capita* brasileiro passou de 29,91 kg de frango, em 2000, para 44,09 kg, em 2010 (UBA, 2011). O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína, tendo produzido em 2009 aproximadamente 3,3 milhões de toneladas e um consumo per capita de 14,24 kg. O Estado do Paraná produziu, em 2009, 478,4 mil toneladas e foi o terceiro produtor nacional (ABIPECS, 2011). Em 2010, a produção brasileira de carne bovina foi de 9,3 milhões de toneladas, tendo sido consumida internamente 80 % dessa produção, com 1,4 milhões de toneladas exportadas *in natura*. O consumo *per capita* foi de 37,4 kg de carne bovina (ABIEC, 2011)

Dado o exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar o sorovar de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carne de frango e de material avícola no estado do Paraná de março de 2009 a março de 2010, e correlacionar os resultados com dados epidemiológicos de saúde pública.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras**

Duzentas e vinte uma amostras (221) de *Salmonella* isoladas de carne de frango (n=178), de swabs de cama de frango de corte (n=19) e de farinha de carne e vísceras de frango de corte (n=24) foram sorotipadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia, do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. O isolamento foi realizado no período de março de 2009 a março de 2010 no Estado do Paraná.

Os sorovares foram separados por região do Paraná e comparados com amostras associadas a surtos e casos esporádicos de salmonelose ocorridos no Paraná em 2009 e 2010, isoladas de material biológico humano e identificadas no Laboratório Central do Paraná, (LACEN, Curitiba, PR).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aves (galinhas, perus, patos e gansos) são os reservatórios mais importantes de *Salmonella* spp. Esses animais desempenham um papel muito importante na epidemiologia da salmonelose pelo fato de serem portadores assintomáticos, e excretarem continuamente *Salmonella* spp. pelas fezes (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Estudos mostram que a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaça de frango pode variar de 0,024% a 85,0%, sendo um veículo importante de transmissão dessa bactéria para o ser humano (KIMURA et al., 2004).

No presente estudo foram sorotipadas 221 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de carne de frango (tabela 1). Um total de 30 sorovares diferentes foi identificado.

**Tabela 1** - Sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carne de frango no Paraná em 2009

Sorovares de <i>Salmonella</i>	Número (% do total identificado)
Minnesota	28 (15,7)
Mbandaka	17 (9,5)
Schwarzengrund	15 (8,4)
Saintpaul	14 (7,8)
Enteritidis	13 (7,3)
Newport	12 (6,7)
<i>Salmonella</i> spp.*	9 (5,0)
Infantis	9 (5,0)
Corvallis	7 (3,9)
Agona	6 (3,4)
Typhimurium	6 (3,4)
Anatum	5 (2,8)
Muenchen	5 (2,8)
Orion	52,79
Ohio	4 (2,2)
Bredeney	3 (1,7)
Derby	3 (1,7)
Gafsa	3 (1,7)
Hadar	2 (1,1)
Havana	2 (1,1)
Rissen	2 (1,1)
Albany, Braenderup, Cerro, Livingstone, Oslo, Panama, Senftenberg, Tennessee	1 isolado de cada sorovar (4,8)
Total	178 (100,0)

Vários autores relataram a predominância no Brasil de SE em carne de frango e de material avícola (SANTOS et al., 2000; FUZIHARA et al, 2000). O aumento da freqüência de isolamento de SE em material avícola ocorreu como resultado do controle e erradicação dos sorovares, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que acarretam grandes prejuízos à avicultura (VAZ, 2007). Porém, alguns estudos recentes demonstram o declínio do predomínio de SE em material avícola e o

isolamento de outros sorovares (BONI, 2007; SALLES et al., 2008; ANDREATTI FILHO et al., 2009). Evidências da redução no isolamento de SE de material avícola foram observadas nos resultados obtidos pelo Mercolab Laboratório LTDA, Cascavel, PR. Em 2007, SE correspondeu a 64% das 119 amostras de *Salmonella* spp. sorotipadas. A percentagem de identificação de SE em 2008 foi de 46%, em 2009 de 1,3% e até outubro de 2010 de 9,1% (informação pessoal de Luciana B. M. Kottwitz).

A diminuição do isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango também tem sido observado nos últimos 10 anos no Estado do Paraná. Gasparetto et al. (2001) relataram que 20 (20%) das 100 amostras de carne de frango comercializadas na cidade de Londrina, PR e analisadas entre outubro de 1999 e março de 2000 estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Das 20 amostras positivas, 12 (60%) estavam contaminadas com *S. Enteritidis*. Em 2007, 66 amostras de carne de frango adquiridas no comércio de Londrina foram analisadas quanto à presença de *Salmonella* spp. e nove (13%) estavam contaminadas, não tendo sido identificado nas amostras positivas o sorovar *Enteritidis* (SILVA et al., 2011).

No presente trabalho observou-se que entre março de 2009 a março de 2010, 178 amostras de carne de frango crua incluídas no Programa Nacional de Redução de Patógenos do Ministério da Agricultura e provenientes de aves abatidas no Paraná e Santa Catarina estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Das cepas de *Salmonella* sorotipadas, *S. Minnesota* foi o sorovar mais isolado (n=28; 15,7 %), seguido de *Mbandaka* (n=17; 9,5 %), *Schwarzengrund* (n=15; 8,4 %), *Saintpaul* (n=14; 7,8 %) e *Enteritidis* (n=13; 7,3 %).

Essa diminuição na frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango pode ser uma consequência do Programa Nacional de Redução de Patógenos implantado em 2003, que tem como principal objetivo construir um sistema de informações sobre contaminação de frangos e perus com *Salmonella* em todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil. A partir do conhecimento dos locais e frequência de isolamento é possível tomar medidas preventivas com a finalidade de reduzir gradativamente a contaminação de aves por *Salmonella* (BRASIL, 2003).

A diminuição gradativa do isolamento de *Salmonella* spp. também pode ter ocorrido pela vacinação para SE das matrizes de corte, o que também justificaria a

menor freqüência de isolamento de SE. Não é possível saber com segurança se essa diminuição na percentagem de contaminação por *Salmonella* spp. e, principalmente, do sorovar Enteritidis levou a um impacto positivo na saúde pública devido a falta de dados epidemiológicos de todos os surtos ocorridos no Paraná em 2009 e 2010.

É muito importante o contínuo monitoramento e a melhoria do diagnóstico em casos esporádicos e de surtos de infecção humana. Embora a freqüência do isolamento de S. Minnesota tenha aumentado, esse sorovar não foi associado a casos esporádicos e surtos de salmonelose ocorridos em 2009 e 2010 no Paraná, diagnosticados no Laboratório de Bacteriologia do LACEN, Curitiba, PR. No entanto, é essencial que as autoridades sanitárias avaliem a repercussão na saúde Pública do aumento do isolamento deste sorovar em carne de frango.

As regiões do Paraná que abatem frangos e *Salmonella* spp. foi isolada foram Oeste, Centro Ocidental, Norte Central e Noroeste (figura 1).

**Figura 1:** Mapa do Paraná dividido em regiões.



Os sorovares de *Salmonella* mais prevalentes do Paraná no ano de 2009 estão apresentados na tabela 2. Na região Centro Ocidental entre 20 isolados foram identificados 15 diferentes sorovares. Na região Norte-Central entre 80 isolados foram identificados 23 diferentes sorovares com predomínio de *S. Corvallis* e *S. Mbandaka*. Na região Oeste foram encontrados 26 sorovares diferentes sendo que *S. Minnesota* foi isolada em 22 das amostras, seguida de *S. Mbandaka*, *S. Newport* e *S. Schwarzengrund* com 11 cada. Na região Noroeste foram encontrados 6 sorovares.

**Tabela 2:** Sorovares de *Salmonella* encontrados nas regiões Centro Ocidental, Noroeste, Norte Central e Oeste do Paraná.

Região do Paraná	Sorovares (número de isolados)
Centro Ocidental (total: 20 isolados)	Corvallis (2), Enteritidis (2), Gafsa (2), Mbandaka (2), Schwarzengrund (2) <i>Salmonella enterica</i> * (2), Anatum (1), Cerro (1), Grumpensis (1), Infantis (1), Orion (1), Panama (1), SaintPaul (1), Worthington (1)
Noroeste (total: 6 isolados)	<i>Salmonella enterica</i> ** (1), Minnesota (1), Orion (1), Oslo (1), Saintpaul (1), Schwarzengrund (1)
Norte Central (total: 80 isolados)	Corvallis (13), Mbandaka (13), Anatum (8), Enteritidis (5), Infantis (5), Livingstone (4), Minnesota (5), Muenchen (4), Schwarzengrund (4), Grumpensis (3), Derby (2), Gafsa (2), Senftenberg (2), Braenderup (1), Ealing (1), <i>Salmonella enterica</i> *** (1), Hadar (1), Havana (1), Newport (1), Orion (1), Saintpaul (1), Tennessee (1), Typhimurium (1)
Oeste (total: 112 isolados)	Minnesota (22), Mbandaka (11), Newport (11), Schwarzengrund (11), Saintpaul (10), Enteritidis (7), Agona (6), Typhimurium (6), <i>Salmonella enterica</i> **** (5), Ohio (4), Bredeney (3), Orion (3), Infantis (2), Muenchen (2), Rissen (2), Albany (1), Corvallis (1), Derby (1), Hadar (1), Havana (1), Panama (1), Tennessee (1)

\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:13,23); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:4,5:-:1,2)

\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:-:e,n,z15)

\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* (O:8:-:1,2)

\*\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:3, 10)

\*\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:3,10:-:1,6)

\*\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:4,5:-:1,2)\*

\*\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:-:e,n,z15)\*

\*\*\*\* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (rugosa)

Os sorovares *S. Corvallis*, *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka*, *S. Orion* e *S. Saintpaul* foram encontradas em três ou mais regiões do Paraná (tabela 3) sendo *S. Corvallis* encontrada em 6 regiões e *S. Saintpau* em 7 regiões.

**Tabela 3:** Sorovares encontrados em três ou mais regiões do Paraná

<b>Sorovares</b>	<b>Região do Paraná (total de isolados)</b>
<i>S. Corvallis</i>	Norte-Central (13), Oeste (1), Centro-Oeste, Metropolitana e Sudoeste (2), Centro Ocidental (2)
<i>S. Enteritidis</i>	Norte-Central (5), Oeste (7), Centro Ocidental (2)
<i>S. Mbandaka</i>	Norte Central (13), Oeste (11), Centro Ocidental (2)
<i>S. Orion</i>	Norte-Central (1), Oeste (3), Centro Ocidental (1), Noroeste (1)
<i>S. Saintpaul</i>	Norte-Central (1), Oeste (1), Centro-Oeste, Metropolitana e Sudoeste (1), Centro Ocidental (1), Noroeste (1)

Alguns sorovares de *Salmonella* foram encontrados em apenas uma região do Paraná (tabela 4) .

**Tabela 4:** Sorovares encontrados em apenas uma região do Paraná

<b>Região do Paraná (total de isolados)</b>	<b>Sorovares (número de isolados)</b>
Centro Ocidental (2)	Cerro (1), Worthington (1)
Noroeste (1)	Oslo (1)
Norte Central (7)	Livingstone (4), Senftenberg (2) Braenderup (1)
Oeste (16)	Agona (6), Ohio (4), Bredeney (3), Rissen (2), Albany (1)

Nove diferentes sorovares de *Salmonella* foram isolados de swab de cama de frango (tabela 5). O sorovar mais freqüente foi Corvallis (n=7; 36,8 %).

Doze diferentes sorovares de *Salmonella* (n=24) foram isolados no presente trabalho de amostras de farinha de carne e de vísceras de frango de corte provenientes do estado do Paraná. Os sorovares Anatum (n=4; 16,7 %) e Mbandaka (n=4; 16,7 %) foram os mais isolados.

As farinhas de origem animal são constantemente mencionadas na literatura como sendo a principal fonte de contaminação de rações por *Salmonella* spp. e,

consequentemente, transmissão para as aves (GABIS, 1991; JONES et al., 1991). O uso de rações não contaminadas com *Salmonella* spp. representa o primeiro passo no controle e redução desta bactéria nesses animais.

A participação da ração e seus componentes como fonte de *Salmonella* para as aves de granjas comerciais foi demonstrada por Berchieri Júnior et al (1993) e Souza (2000) que isolaram diversos sorovares de *Salmonella*. Para esses autores a farinha de carne é considerada o principal veículo de *Salmonella* para granjas avícolas.

**Tabela 5:** Sorovares de *Salmonella* isolados de swab de cama de frango e de farinha de carne e vísceras de frango em 2009 no estado do Paraná.

Swab de cama de frango		Farinha de carne e de vísceras	
Sorovar de <i>Salmonella</i> isolado	Número (% do total identificado)	Sorovar de <i>Salmonella</i> isolado	Número (% do total identificado)
Corvallis	7 (36,8)	Anatum	4 (16,7)
Mbandaka	3 (15,8)	Mbandaka	4 (16,7)
Infantis	2 (10,5)	Corvallis	3 (12,5)
Schwarzengrund	2 (10,5)	Infantis	3 (12,5)
Gafsa	1 (5,3)	Grumpensis	2 (8,3)
Grumpensis	1 (5,3)	Livingstone	2 (8,3)
Panamá	1 (5,3)	Ealing	1 (4,2)
Senftenberg	1 (5,3)	<i>S. enterica</i> *	1 (4,2)
Tennessee	1 (5,3)	Enteritidis	1 (4,2)
		Muenchen	1 (4,2)
		Orion	1 (4,2)
		Schwarzengrund	1 (4,2)
Total	19 (100,0)	Total	24 (100,0)

\**S. enterica* subsp. *enterica* (O:6,7:-:e,n,z15)

Avaliando os dados epidemiológicos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 a 2004, Alcocer (2004) observou que 89,8% das cepas de *Salmonella* isoladas dos alimentos envolvidos nos surtos eram do sorovar Enteritidis. Além disso, carne de aves, ovos e derivados foram os principais alimentos responsáveis pelos surtos ocorridos nesse período. No presente estudo pode-se verificar que SE esteve presente nas regiões analisadas; sudoeste, noroeste e centro-oeste; com as respectivas prevalências, 5,20%, 4,54% e 10%.

Porcentagens crescentes estão sendo registradas no Brasil desde o primeiro relato da ocorrência de SE em aves, realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo. Dados Epidemiológicos do Instituto Adolfo Lutz indicam que no

período entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* passou de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% para as amostras não-humanas (SILVA; DUARTE, 2002). Santos et al. (2002) identificaram SE em 69,8% das amostras de alimentos envolvidos em surtos alimentares ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, entre 1995 e 1996. No Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2003, SE foi identificada em 67,4% dos isolados de fonte humana (FERNANDES et al., 2006). Demonstrando que SE emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993 (FERNANDES et al., 2003; SILVA; DUARTE, 2002).

No Paraná, a partir de 1995, a salmonelose passou a ser a principal doença transmitida por alimentos e no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2008, 286 surtos de salmonelose ocorreram neste Estado. Na tabela 6 estão apresentados os dados epidemiológicos fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia do LACEN, Curitiba, PR que analisa material biológico de pacientes com suspeita de salmonelose. Os dados são provenientes de diferentes Regionais de Saúde do Paraná sendo referentes a 40 surtos de gastroenterite e 68 casos esporádicos de salmonelose perfazendo um total de 182 gastroenterites, 13 bacteremias, uma infecção urinária, e duas infecções de ferida. Nestes dados não estão computados os surtos de salmonelose diagnosticados no Laboratório de Bromatologia do LACEN, Curitiba, PR que analisa os alimentos associados aos surtos porque esse Laboratório não tem como rotina a identificação do sorovar das cepas de *Salmonella* isoladas.

Todos os sorovares associados a casos esporádicos e surtos salmonelose ocorridos no Paraná em 2009 e 2010 também foram isolados de carne de frango (tabela 1) ou de material avícola (tabela 5) em 2009, com exceção de *S. typhi*, *S. Adelaide* e *S. enterica* subsp. *houtenae*. Embora não tenha sido feito nenhuma avaliação molecular de semelhança entre as cepas isoladas é muito provável que produtos avícolas ainda continuem sendo importantes veículos de transmissão de *Salmonella* para o ser humano no Paraná.

O sorovar *S. Corvallis*, responsável por dois casos de infecção esporádica de salmonelose em 2010, não tinha sido associado a essa infecção, porém já havia sido isolado anteriormente de material biológico avícola (SOUZA et al., 2011)

Embora não tenha sido saber se a diminuição na porcentagem de contaminação por *Salmonella* spp. e, principalmente, pelo sorovar Enteritidis na

avicultura levou a um impacto positivo na Saúde Pública é muito importante o contínuo monitoramento e a melhoria do diagnóstico de casos esporádicos e de surtos de infecção humana. Medidas de biossegurança permitiram em meados de 1980 a abertura de um nicho ecológico para *S. Enteritidis*. De modo semelhante, as medidas aplicadas atualmente para o controle de SE poderão resultar em sua substituição por outro sorovar, o que precisa ser avaliada pelas autoridades sanitárias.

**Tabela 6:** Sorovares de *Salmonella* isolados de material biológico humano associados a surtos e casos de salmonelose ocorridos no Paraná de 2004 a 2010.

Sorovar	Ano							Total	%
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010		
S. Enteritidis	44	29	13	15	34	4	9	148	67,0
S. Typhimurim	4	1	3	4	3	7	7	29	13,0
S. London	1	1						2	0,9
S. Newport				1				1	0,45
S. Gloucester	1							1	0,45
S. Schwarzengrund	2							2	0,9
S. Infantis		2			1	1	1	5	2,26
S. Dublin					1			1	0,45
S. Typhi				1	1	1		3	1,36
S. SaintPaul	1							1	0,45
S. Panama				1		1	2	4	1,8
S. Johannesburg			4					4	1,8
S. Derby			2					2	0,9
S. enterica <sup>1</sup>			2		2			4	1,8
S. Anatum			1				1	2	0,9
S. Javiana					1			1	0,45
S. Corvallis							2	2	0,9
S. Muechen							2	2	0,9
S. Bredeney							1	1	0,45
S. Grumpensis							1	1	0,45
S. Adelaide						1		1	0,45
S. enterica <sup>2</sup>							1	1	0,45
S. enterica <sup>3</sup>							1	1	0,45
S. enterica <sup>4</sup>						2		2	0,9
TOTAL	53	33	25	22	43	17	28	221	100

<sup>1</sup> *S. enterica* subsp. *enterica* 4,5,12:i:-

<sup>2</sup> *S. enterica* subsp. *enterica* 4,5

<sup>3</sup> *S. enterica* subsp. *enterica* 3,10:eh

<sup>4</sup> *S. enterica* subsp. *houtenae*

**Fonte:** Sônia M.S.S. Farah. Setor de Bacteriologia, Laboratório Central do Paraná (LACEN, Curitiba, PR)

## **CONCLUSÃO**

Embora a frequência do isolamento de S. Minnesota tenha aumentado, esse sorovar não foi associado a casos esporádicos e surtos de salmonelose ocorridos em 2009 e 2010 no Paraná. No entanto, é essencial que as autoridades sanitárias avaliem a repercussão na saúde Pública do aumento do isolamento deste sorovar em carne de frango.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, 2011. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/download/fluxo\\_por.pdf](http://www.abiec.com.br/download/fluxo_por.pdf). Acesso em 24 de agosto de 2011.

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 2011. Disponível em: [http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/consumo/Oferta\\_e\\_demanda.pdf](http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/consumo/Oferta_e_demanda.pdf). Acesso em 24 de agosto de 2011.

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.** 216p. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina - PR

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isolados em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** São Paulo. 2006. 99p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] – Universidade de São Paulo. SP.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; I RINO, K.; QUINTANA, J.L.; SANTOS, A.J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. *Revista de Microbiologia.*, v.24, n.1, p.22-25, 1993.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48 (4), p.179-184,2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes long the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**. V.63, p. 1749-1753, 2000.

GABIS, D.A. Environmental factors affecting enteropathogens in feed and feed mills. In: BLANKENSHIP, L.C. (Ed.). **Colonization control of human bacterial: enteropathogens in poultry**. San Diego: Academic Press, 1991. p.23-27. (Food science and technology: a series of monographs).

GERMANO, P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3.ed.rev. e ampl. 986 p. São Paulo: Manole, 2008.

JONES, F.T.; AXTELL, R.C.; RIVES, D.V. *et al.* A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.7, p.502-507, 513, 1991.

KIMURA, A.C.; REDDY, V.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; MOHLE-BOETANI, J.C.; KASSENBERG, H.D.; SEGLER, S.D.; HARDNETT, F.P.; BARRET, T.; SWERDLOW, D.L. Emerging Infections Program FoodNET Workinh Group. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella* enterica serotype *enteritidis* infections in the United States: a case-control study im FoodNet sites. **Clin. Infect.Dis.**, v.38, suppl 3, p.244-252. 2004.

LAPUZ, R.; TANI, H.; SASAI, K; SHIROTA, K; KATOH, HH.; BABA, E. An epidemiological analysis os Salmonelle Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. **J.Vet.Med.Sci.**, v69, n.6, p.649-652, 2007.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congelado. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.20, 2000.

SANTOS, L. R. *et.al.* *Salmonella* Entteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. Brasil, v. 16, p. 93-99, 2002.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.4, n.2, p. 85-100, 2002.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; FERRARI, R. G.; KOTTWITZ, L. B. M.; SARTORI, D.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Detection of quinolone-resistance mutations in *Salmonella* spp. strains of epidemic and poultry origin. **Braz. J. Microbiol.**, v.42, p.211-215, 2011.

UBA - UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/index.php>. Acesso em 24 de agosto de 2011.

VAZ, C.S.L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella* Enterica subsp. Enteric sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre. 135p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, 2011. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/download/fluxo\\_por.pdf](http://www.abiec.com.br/download/fluxo_por.pdf). Acesso em 24 de agosto de 2011.

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, 2011. Disponível em: [http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/consumo/Oferta\\_e\\_demanda.pdf](http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/consumo/Oferta_e_demanda.pdf). Acesso em 24 de agosto de 2011.

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.** 216p. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina - PR

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, K.M; VIDOTTO, M.C.; OLIVIRA, T.C.R.M. Discriminação de Sorovares de *Salmonella* spp.. Isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e Fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2), p. 414-420, 2006.

ALVES, L.M.C., COSTA, F.N., SILVA, M.I.S., SALES, S.S., CORREA, M.R. Toxinfecção Alimentar por *Salmonella Enteritidis*: relato de um surto ocorrido em São Luiz – MA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80, p. 57-58, 2001;

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por Alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ver. Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n.6, p.1139-1145, 2006.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isolados em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** São Paulo. 2006. 99p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] – Universidade de São Paulo. SP.

BAILEY, J.S., COX, N.A., BLANKENSHIP, L.C. A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring *Salmonella* e from processed broiler

carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 354, 1991;

BAILEY, J.S.; COX, N.A. **Detecting specific *Salmonella* strains**, **World Poultry, Special for *Salmonella***, Netherlands, p.18-19, 1996.

BARROS, V.R.M., PAVIA, P.C., PANETTA, J.C. *Salmonella* Spp.: Sua Transmissão através dos Alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 94, p. 15-19, 2002;

BARROW PA. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. **Epidemiology and Infection** 1992; 108:231-241.

BARROW, P. A.; LOVELL, M.A.; BERCHIERI, A. **The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4**. Avian Pathology 1991; 20: 681-692.

BARROW, P. A. ***Salmonella* – presente, past and future**. Avian Pathology 1993; 22: 651-669.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K.; QUINTANA, J.L.; SANTOS, A.J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.24, n.1, p.22-25, 1993.

COWDEN, J.M.; LYNCH, D.; JOSEPH C. A.; O'MAHONEY, M.; MARWER, S.L.; ROWE, B.; BARTLETT, C.L.R. Case-control study of infections with *Salmonella enteritidis* phage type 4 in England. **British Medical Journal** 1989; 299: 771-773.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 342-346.

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

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin Microbiol.**, Washington, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62 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, 2003a.

BIOLAB-MÉRIEUX S. A. **Manual Sistema VIDAS® e Mini-Vidas®**, Estrada do Mapuá 491 – Jacarepaguá – RJ – Brasil, CEP: 22710-261. s.d.

CDC – Center for Disease Control. **Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention**, Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5723md.htm>. Capturado em 18 de junho de 2008 as 11:10 h.

CHAU, P.Y., HUANG, C.T. A one-day selective migration procedure for detecting *Salmonellae* in faeces. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, p. 405- 407, 1974;

COSTALUNGA, S. ;TONDO, E.C. Salmonellosis in RIO Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**. V.33, p.342-346, 2002.

CURIALE, M.S., KLATT, M.J., ROBISON, B.J., BECK, L.T. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening methods for detection of *Salmonella* in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 73, p. 43-50, 1990;

CDC. **Salmonella Surveillance Summary**, 2003, Atlanta, Georgia: U.S. Departamento f Health and Human Services, CDC,2005. Disponível em : <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2002/salmonellaannualsummary2003.pdf>. Acesso em 30 de maio de 2005.

D'AOUST, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 17-40, 1991.

DE MEDICI, E., D., Pezzotti, G., MARFOGLIA, C., CACIOLO, D., FOSHI, G., OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poltry meat. **International Journal of Fodd Microbiology** n.45, p 205-210, 1998.

De SOUZA, R.B. **Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana e Avaliação**

**Molecular da Resistência à Quinolonas de Cepas de *Salmonella* epidêmicas e de origem avícolas isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil. Londrina 2008.** 86p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F.M.; DUARTE, L.F. Microbiologia convencional, ELISA, e PCR para para Detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v.19, n. 133, p. 79-85, 2005.

European Food Safety Authority (EFSA). **The EFSA Journal**, 625, p. 1-25, 2008;

EIJKELKAMP, J.M. Suitability of Rapid Detection Methods for *Salmonella* in Poultry Slaughterhouses. **Food Anal. Methods (2009) 2:1-13 DOI 10.1007/s12161-008-9040-5**, 2008.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48 (4), p.179-184,2006.

FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., NERI, M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1146-1151, 1983;

FLOWERS, R.S., KLATT, M.J., KEELAN, S.L., Visual immunoassay for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 973-989, 1988;

FORSYTHE, S.J., **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 424p. 1ª Ed. São Paulo: Artmed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003;

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**. V.63, p. 1749-1753, 2000.

GABIS, D.A. Environmental factors affecting enteropathogens in feed and feed mills. In: BLANKENSHIP, L.C. (Ed.). **Colonization control of human bacterial: enteropathogens in poultry**. San Diego: Academic Press, 1991. p.23-27. (Food science and technology: a series of monographs).

GARRICK, R.C.; SMITH, A.D. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in applied Microbiology**, v. 18, p. 187-189., 1994;

GERMANO, P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 629 p. São Paulo; Livraria Varela, 2001.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3.ed.rev. e ampl. 986 p. São Paulo: Manole, 2008.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: Um problema /técnico bastante complexo.**Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, n.68/69, v.14, jan/fev. p.58-61,2000.

HAO, Y.Y.; SCOUTEN, A. J.; BRACKETT, R. E. Cheesecake: A potential vehicle for salmonellosis?, **Journal of Food Protection**, v. 62, n.1, p.26-29, 1999.

HEYNDRICKX, M.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. **The Veterinary Journal**, v. 170p. 285-294, 2002.

HOLBROOK, R., ANDERSON, J.M., BAIRD-PARKER, A.C. DODDS, L.M.,

SAWHNEY, D., STUCHBURY, S.H., SWAINE, D. Rapid detection of *Salmonella* in foods – a convenient two-day procedure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 139-142, 1989;

HOLT, G. J.; KRIEG, R. N.; SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787 p.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods – **Microbiología de los alimentos: Características de los patógenos microbianos, vol. 5, p. 606. Editorial Acribia, S.A. 1996;**

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp.. ocorridos na Grande São Paulo, no período de 194 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6. Ed. An Aspen Publication, 2000, 679p.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. New York. International Thomson Publishing, 5th ed., p 507 – 526, 2005;

JONES, F.T.; AXTELL, R.C.; RIVES, D.V. et al. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.7, p.502-507, 513, 1991.

KAKU, M.; PERSI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S. A; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.2, p.127-131, 1995.

KIMURA, A.C.; REDDY, V.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; MOHLE-BOETANI, J.C.; KASSENBERG, H.D.; SEGLER, S.D.; HARDNETT, F.P.; BARRET, T.; SWERDLOW, D.L. Emerging Infections Program FoodNET Workinh Group. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella* enterica serotype *enteritidis* infections in the United States: a case-control study im FoodNet sites. **Clin. Infect.Dis.**, v.38, suppl 3, p.244-252. 2004.

KOTTWITZ, L. **Contaminação por *Salmonella* spp.. em uma cadeia de produção de ovos.** Londrina. 2005. 105. 105 p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina – PR.

KOTTWITZ, L. ***Salmonella* spp.: Avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola.** Londrina. 2009. Dissertação [Doutorado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina – PR.

KOTTWITZ, L.B.M., BACK, A., LEÃO, J.A., ALCOGER, I., KARAN, M. OLIVEITA, T.C.R.M. Contaminação por *Salmonella* spp.. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p. 496-498, 2008.

LAPUZ, R.;TANI, H.; SASAI, K; SHIROTA, K; KATOH, HH.; BABA, E. An epidemiological analysis os Salmonelle Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. **J.Vet.Med.Sci.**, v69, n.6, p.649-652, 2007.

LOU, Q.C., CHONG, S.K., FITZGERALD, J.F. Rapid and Effective Method for preparation of Fecal Specimens for PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Jan, p. 281-283, 1997;

LOUGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M. ELISA INDRETO na detecção de *Salmonella* spp.. em lingüiça suína. **Ciênc. Rural.**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1057-1062, 2002.

MALHEIROS, P.S.; DE PAULA, C.M.D.; TONDO, E.C. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comaração com linhagens de outros sorovares. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 27(4): 751-755, 2007.

MATA, M. S. C., **Comparação de métodos para Pesquisa de Salonella sp. E Listeria sp. e Avaliação microbiana e Físico-Química em Queijo Minas Artesanal.** Dissertação [Magister Scientiae] Universidade Federal de Viçosa. 2009

MATTICK, K. L.; BAILEY, R. A.; JORGENSEN, F.; HUMPHREY, T. J. The prevalence and number of *Salmonella* in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. **93**, n. **4**, p. **541-547**, 2002.

MOURA , Aline Mesquita Galvão .AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE BACTERINAS COMERCIAIS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis EM GALINHAS DE POSTURA COMERCIAL. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Campus de Jaboticabal, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária-Área de concentração em Patologia Animal Jaboticabal- São Paulo- Brasil 2007

OKTAY, H.I.; HEPERKAN, D. Evaluation of ISO method and VIDAS<sup>®</sup> automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in the selected foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology** **14**, p. 133-145, 2006.

OLIVEIRA, D. D.; E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.6, dez. 2000.

PATEL, P. D. (2000) ***Salmonella* detection by enzyme immunoassays**. In *Encyclopedia of Food Microbiology* ed. Robinson, R. K.; BATT, C. A. and Patel, P. D. pp. 1956-1964. London: Academic Press.

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

PONTES, A. **Avaliação da reação da Cadeia pela Polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* sp em amostras ambientais de origem avícola (“swab de arrasto”)**, Dissertação de mestrado – Porto Alegre, 1999;

PINTO, M. V.; OLIVEIRA, M.; BERNARDO F.; MARTINS C. **Rapid detection of *Salmonella* sp. In pork samples using fluorescent *in situ* hybridization: a**

**comparison with VIDAS® -SLM system and ISSO 6579 cultural method.**

Departamento de Ciências Veterinárias CECAV Universidade de Trás-os-Montes e Alto Dourado Apartado 1013, 500-911 – Vila Real Portugal. Faculdade de Medicina Veterinária – Lisboa, Portugal. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.6, p. 1388-1393,2007.

POPOFF, M.Y., LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, Pasteur Institute, France. 1997.

POPOFF, M. Y., J. Bockemuhl and L. L. Gheesling. (2004). "Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. 155:568-570.

POPOFF, M.Y., Le MINOR, L.E.; **The Genus *Salmonella***. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Editors). Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed.; v.2, Springer, New York, USA, p. 764-799. 2005.

POPPE, C.; DUNCAN, C.L. Comparison of Detection of *Salmonella* by the Tecra Unique *Salmonella* test and the modified Rappaport Vassiliadis medium. **Food Microbiology**, v. 13, p. 75-81, 1996;

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P., *Salmonella* spp. . in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.296-299, 2007.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congelado. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.20, 2000.

SANTOS, L. R. et.al. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. Brasil, v. 16, p. 93-99, 2002.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.4, n.2, p. 85-100, 2002.

SOUSA, C. L., PEIXOTO, M. R. S., SILVA, E. C., OLIVEIRA, R. I. Avaliação da Qualidade microbiológica e físico-química da carne bovina moída em açougues do município de Macapá – AP. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 72, p. 60-65, 2000.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; FERRARI, R. G.; KOTTWITZ, L. B. M.; SARTORI, D.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Detection of quinolone-resistance mutations in *Salmonella* spp. strains of epidemic and poultry origin. **Braz. J. Microbiol.**, v.42, p.211-215, 2011.

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

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B.C.; DIAS, A. M. G.; IRINO. K. Changing patterns of *Salmonella* serovares: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 38(5):315-332, 1996.

TAVECHIO. A.T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar 1,4,[5], 12:i:- e *Salmonella* Typhimurium** São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências].

TÉO, C.R.P.A., OLIVEIRA, T.C.R.M., *Salmonella* spp.: The egg as vehicle of transmission and the implications of resistance for public health. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n.2, p.195-210,2005.

TIEJEN, M., FUNG, D.Y.C. *Salmonellae* and Food Safety. **Crit. Rev. Microbiol.** Cleveland, v. 21, p. 53-83, 1995.

TINDALL (B.J.), GRIMONT (P.A.D.), GARRITY (G.M.) and EUZÉBY (J.P.): Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, **55**, 521-524.

UBA - UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/index.php>. Acesso em 24 de agosto de 2011.

VAZ, C.S.L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella* Enterica subsp. Enteric sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre. 135p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

VIANA, S. A. Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, 1998-001. 2002. 79f. Monografia [Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Gestão em Saúde]-Escola de Saúde Pública "Dr. Jorge David Nasser", Campo Grande, 2002.

VIEIRA-PINTO, M.; OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F.; MARTINS, C. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS-SLM system and ISSO 6579 traditional method. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.1388-1393, 2007.

VON RÜCKERT, D. A. S. Comparação dos métodos microbiológico tradicional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

WALKER, R. L., KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison os VIDAS<sup>®</sup> enzyme-linked fluorescent immunoassay using MOORE swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, n.67, p.123-129, 2001.

WHEELER, J.G., SETHI, D., COWDEN, J.M. et al. Study of infections intestinal diseases in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **BR. Med. J.** v.318, p.1046-1050, 1999.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COLLINS, J.D. and GORMELEY, E. (2002) **The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry.** *Veterinary Microbiology* 89, 53-60.

WOO, Y.K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis. **Journal of Microbiology**, 43:424-429, 2005.

YEH, K.; TSAI, C. E.; CHEN, S. P.; LIAO, C. W. Comparison between VIDAS<sup>®</sup> automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 10, p. 1656-1659, 2002.

ZHAO, S.; McDERMOTT, P.F.; FRIEDMAN, S.; QAIYUMI, S.; ABBOTT, J.; KIESSLING, C.; AYERS, S.; SINGH, R.; HUBERT, S.; SOFOS, J.; WHITE, D.G. Characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from imported foods. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 500-507, 2006.

## ANEXO

### Amostras

Foram analisadas 947 amostras de carne bovina, e de frango produzidas no Paraná empregando o método imunológico VIDAS<sup>®</sup> (Bio Merieux), 5825 utilizando o método molecular BAX<sup>®</sup> (DUPONT-QUALICOM) no período de março de 2009 à março de 2010 e 2442 utilizando o método molecular BAX<sup>®</sup> (DUPONT-QUALICOM) no período de Janeiro a Junho de 2011 .

Foram analisadas 72.442 amostras de produtos cárneos lácteos e derivados nos anos de 2008, 2009, 2010 e 2011, de acordo com a tabela abaixo.

<b>ANO</b>		<b>N° total de amostras analisadas</b>	<b>N° amostras analisadas VIDAS</b>	<b>N° Amostras analisadas BAX</b>	<b>N° de Amostras analisadas Tradicional</b>
<b>2008</b>	Total	19847	9695	0	10152
	Aves	10381	7180	0	3201
	Bovinos	543	147	0	396
	Suínos	573	25	0	548
	Outros	8350	2343	0	6007
<b>2009</b>	Total	23804	1026	5414	17364
	Aves	12451	760	4010	7682
	Bovinos	652	16	82	554
	Suínos	688	3	14	672
	Outros	10013	248	1308	8457
<b>2010</b>	Total	24387	0	4701	19686
	Aves	12756	0	3482	9274
	Bovinos	668	0	71	597
	Suínos	705	0	12	693
	Outros	10258	0	1136	9122
<b>Jan- Abril 2011</b>	Total	5582	0	2303	3279
	Aves	2919	0	1706	1213
	Bovinos	152	0	35	117
	Suínos	84	0	6	78
	Outros	2427	0	557	1870