

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DETECÇÃO MOLECULAR DE
Salmonella sp. EM AMOSTRAS AVÍCOLAS

Nadielly Xavier de Medeiros

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Nadielly Xavier de Medeiros		
E-mail:	nadiellyxavier@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Não		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Detecção molecular de <i>Salmonella</i> sp. em amostras avícolas		
Palavras-chave:	diagnóstico, frangos, PCR em tempo real, <i>Salmonella</i> sp.		
Título em outra língua:	Molecular detection of <i>Salmonella</i> sp. in poultry samples		
Palavras-chave em outra língua:	broiler, diagnostic, real-time PCR, <i>Salmonella</i> sp.		
Área de concentração:	Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	21/06/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-graduação em Ciência Animal		
Orientador (a):	Prof ^a . Dr ^a . Cíntia Silva Minafra e Rezende		
E-mail:	cintiaminafra@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Prof. Dr. Albenones José de Mesquita		
E-mail:	prof.albenones@fapeg.go.gov.br		
Co-orientador (a):*	Prof. Dr. Cristiano Sales Prado		
E-mail:	pradocs@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Nadielly Xavier de Medeiros
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 06 / 12 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

NADIELLY XAVIER DE MEDEIROS

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella* sp. EM AMOSTRAS AVÍCOLAS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Controle de qualidade de alimentos

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende
- EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita –
EVZ/UFG

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado –
EVZ/UFG

GOIÂNIA
2013

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Xavier de Medeiros, Nadielly
DETECÇÃO MOLECULAR DE Salmonella sp. EM AMOSTRAS
AVÍCOLAS [manuscrito] / Nadielly Xavier de Medeiros. - 2013.
LI, 51 f.

Orientador: Prof. Dr. Cíntia Silva Minafra e Rezende; co-orientador
Dr. Albenones José de Mesquita; co-orientador Dr. Cristiano Sales
Prado .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ) , Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2013.

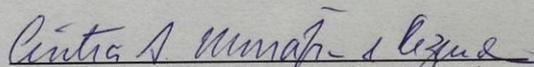
Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de tabelas.

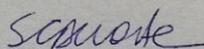
1. diagnóstico. 2. frangos. 3. PCR em tempo real. 4. Salmonella sp.. I.
Silva Minafra e Rezende, Cíntia , orient. II. José de Mesquita,
Albenones, co-orient. III. Título.

Nadielly Xavier de Medeiros

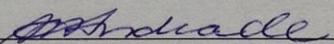
Dissertação defendida e aprovada em **21/06/2013**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Sabrina Castilho Duarte – Faculdade Objetivo



Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega, no outro vai embora. Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz...”

Almir Sater

Ao meu pai, que acreditou nos meus sonhos, que me permitiu viver e ao mesmo tempo sonhar e lutar para alcançar meus objetivos. Embora não presente fisicamente aqui hoje, sei que em algum lugar está de alguma forma compartilhando deste momento e da minha felicidade pela conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde que me proporciona todos os dias.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende por toda a atenção, pelo apoio, dedicação, compreensão e amizade e por compartilhar o seu conhecimento.

À Prof^a Dr. Sabrina Castilho Duarte e Thaís Miranda Silva Freitas pela ajuda no desenvolvimento deste experimento.

Às amigas do curso de pós-graduação, Aline Pedrosa de Oliveira, Janaina Costa Feistel e Marília Cristina Sola, pelos conselhos e pelos agradáveis e descontraídos momentos que passamos durante o curso.

Ao meu amigo e confidente Marcos Paulo Roque.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água pela compreensão e auxílio.

A todos os professores e funcionários do curso de Mestrado em Ciências Animal da Universidade Federal de Goiás.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e toda minha família, pelo amor e carinho e por terem proporcionado a educação que foi a base de minha formação.

Às minhas amigas pela atenção e paciência durante todo o curso e sempre.

A todos que de alguma maneira ajudaram a realizar este trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 <i>Salmonella</i> sp.....	4
2.2 <i>Salmonella</i> sp. na avicultura.....	4
2.3 Legislação	5
2.4 Contaminação de lotes de frangos.....	6
2.5 Contaminação de carcaças	8
2.6 Prevenção e controle da <i>Salmonella</i>	9
2.7 Diagnóstico molecular aplicado à avicultura.....	10
2.7.1 PCR convencional.....	11
2.7.2 PCR em tempo real.....	12
2.7.3 Aplicações da técnica de PCR	13
2.8 Interferências na análise de PCR.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Amostragem e análises bacteriológicas convencionais	16
3.2 ELFA	17
3.3 Extração do DNA.....	17
3.4 PCR convencional.....	18
3.5 PCR em tempo real.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Frequência de <i>Salmonella</i> sp. por identificação (isolamento bacteriano convencional - IBC) e detecção de em caldo de pré-enriquecimento congelado pelos ensaios VIDAS [®] -SLM, PCR em tempo real (PCR – rt) e no PCR convencional (PCR – c)20
TABELA 2	Compatibilidade entre presença (+) ou ausência (-) para os ensaios VIDAS [®] -SLM, PCR em tempo real (PCR – rt) e PCR convencional (PCR – c), em caldos positivos pelo IBC e seus respectivos sorovares.....21
TABELA 3	Caldos de pré-enriquecimento negativos ao isolamento bacteriano e positivos no VIDAS-SLM, PCR em tempo real e/ou no PCR convencional.....22
TABELA 4	Amostras positivas à PCR em tempo real separadas por categoria.....25

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
C_T	<i>Cycle Threshold</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
BGS	Ágar verde brilhante com sulfa
XLT4	Ágar xilose lisina tergitol 4
dATP	DesoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	DesoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	DesoxiGuanosina Trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNases	Desoxirribonucleases
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
dTTP	DesoxiTimidina Trifosfatada
dNTP`s	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ELFA	Enzimas ligadas a anticorpos fluorescentes
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg/mL	miligramas por mililitros
mM	miliMolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RV	Rappaport-Vassiliadis
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum
S.I.F.	Serviço de Inspeção Federal
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
TT	Tetrationato
UBA	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitros

RESUMO

Salmonella é reconhecida como agente etiológico de intoxicações alimentares e classifica-se como um dos microrganismos de maior relevância à saúde pública, bem como ao monitoramento dos plantéis avícolas. Esta bactéria está amplamente distribuída no meio ambiente, e possui portadores assintomáticos, o que, também, favorece sua disseminação durante etapas do processamento de alimentos, transformando-se em grande problema para as agroindústrias. O monitoramento de patógenos em abatedouros de aves demanda a aplicação de metodologias rápidas e confiáveis. Com o intuito de investigar a presença de *Salmonella* em abatedouros, objetivou-se avaliar suabes de depenadeiras e de calhas de evisceração, carcaças, coração, fígado e moela de aves. As análises laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e circunscreveram-se à investigação laboratorial de caldos de pré-enriquecimento compostos por água peptonada a 1%, adicionados das amostras. Para tanto, após a inoculação das amostras os caldos foram incubados pelo período de 18 a 24 horas e em seguida congelados a temperatura de -18°C, para posteriormente, serem analisados. Os métodos analíticos de eleição, para detecção de *Salmonella* sp., foram a reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e PCR em tempo real, havendo também verificação para estudos prévios com isolamento bacteriano convencional e VIDAS-SLM. Os genes alvo foram, respectivamente, *iroB* e *bipA*, associados à virulência da bactéria e sua adaptação frente às situações de estresse. Moela foi a categoria de amostra de maior percentual de contaminação (13,3%). Verificou-se que a técnica de PCR em tempo real foi capaz de identificar maior número de amostras positivas, 22 (7,3%) em comparação à PCR convencional que detectou cinco (1,6%), no entanto, não houve equivalência à maioria dos resultados prévios do isolamento bacteriano total. Conclui-se que a PCR em tempo real pode agilizar o diagnóstico laboratorial, sendo feito pré-enriquecimento seletivo com aplicação do meio de cultura de forma imediata e que *Salmonella* está presente em alimentos de origem avícola e em instalações e equipamentos.

Palavras-chave: diagnóstico, frangos, PCR em tempo real, *Salmonella* sp.

ABSTRACT

Salmonella is recognized as an etiological agent of food poisoning and it is classified as one of the most relevant microorganisms to public health, as well as to the monitoring of poultry industry. Salmonella is widely spread in environment and has asymptomatic transmitters, which also favors its spread during food processing steps, becoming a considerable problem for the processing industry. Monitoring pathogens in poultry slaughterhouses demands the application of fast and reliable methodologies. In order to investigate the presence of Salmonella in slaughterhouses, this study aimed to evaluate swabs of picking machines and evisceration flume, carcasses, hearts, livers, and gizzards of poultry. Laboratory tests were developed in the Laboratory of Bacteriology and Molecular Biology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Medicine Veterinary College and Animal Science of the Universidade Federal de Goiás (Federal University of Goiás), and circumscribed to the laboratory research of pre-enrichment broths composed of peptone water to 1%, added to the samples. Therefore, after inoculation of broth samples were incubated for a period of 18 to 24 hours, and then frozen at -18 °C for a later analyzes. The analytical methods of choice for detecting Salmonella sp. were conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR, there had been also check for previous studies with conventional bacterial isolation and VIDAS - SLM. Target genes were, respectively, *iroB* and *bipA*, associated to bacterial virulence and its adaptation face to stressful situations. Gizzard was the sample category with the largest contamination percentage (13.3%). The real-time PCR technique was able to identify a greater number of positive samples, 22 (7.3%) compared to 5 (1.6%) by conventional PCR; however, there was no equivalent to the most previous results of total bacterial isolation. In conclusion, Real-time PCR can expedite the laboratory diagnosis, being made selective enrichment with immediately pre-application of the culture method, and salmonella is present in poultry source food, in installations, and equipment.

Keywords: broiler, diagnostic, real-time PCR, *Salmonella* sp.

1 INTRODUÇÃO

A partir dos anos de 1970, quando se iniciaram as exportações brasileiras de carne de frango, a avicultura industrial brasileira foi consolidada como um segmento moderno fortemente estimulado por políticas públicas (BELUSSO & HESPANHOL, 2010).

Em 2011, a produção de carne de frango chegou a 13,058 milhões de toneladas, um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno e 30,2% para exportações. Com isto, o consumo *per capita* de carne de frango atingiu 47,4 quilos por pessoa, um novo recorde para o setor (UBA, 2012).

No primeiro trimestre de 2012 foram abatidas 1,363 bilhão de cabeças de frangos, representando aumento de 3,2% em relação ao trimestre imediatamente anterior e de 4,3% frente ao mesmo período de 2011. Desde 2010, o abate de frangos tem sido crescente, no comparativo dos mesmos trimestres de cada ano (IBGE, 2012).

As condições sanitárias constituem grandes barreiras para a comercialização da carne de frango. As rígidas legislações visam a ausência de microrganismos que podem colocar em risco a saúde do consumidor (CARDOSO & TESSARI, 2008).

O perfil epidemiológico das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no Brasil é pouco conhecido. São poucos os municípios e estados que dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns; alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes. A incidência varia de acordo com diversos aspectos: educação, condições socioeconômicas, saneamento, fatores ambientais, culturais e outros (BRASIL, 2010).

A salmonelose é, no Brasil e no mundo, um desafio para a saúde pública. Desde a década de 70, tem ocorrido um aumento acentuado e

contínuo do número de casos vinculados a determinados sorotipos (CARDOSO & TESSARI, 2008).

Salmonella sp. está amplamente distribuída na natureza, os animais e o homem são os principais reservatórios naturais. A existência de portadores assintomáticos e permanência nos alimentos e no ambiente contribuem para que este patógeno seja considerado como um dos principais agente envolvidos em surtos de origem alimentar, portanto assume grande relevância na saúde pública mundial (CARDOSO & TESSARI, 2008).

As aves são responsáveis pela maior disseminação da *Salmonella*, agente causador da salmonelose, desse modo, é imprescindível que medidas sanitárias sejam implantadas na criação. A alta disseminação desta bactéria na avicultura e a ocorrência de surtos de enfermidades causam elevados prejuízos econômicos, tanto para o governo quanto para a indústria produtora (SHINOHARA et. al., 2008).

A transmissão transovariana e horizontal de *Salmonella* sp. em ovos pode ser disseminado e persistir na indústria avícola. Este patógeno é facilmente disseminado nas excretas de uma ave e permanece no ambiente, isto pode infectar outras aves por muitos anos, caso não seja feito a higienização correta do aviário (KOTTWITZ et al., 2008).

A presença de *Salmonella* sp. em produtos de frangos de abate e seus derivados, demonstra a importância do controle da infecção dos animais ainda na criação para conter a cadeia de transmissão da infecção (MOREIRA, 2002). Sob esse contexto, programas foram criados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) para atestar a segurança no sistema de criação da cadeia produtiva de carnes de aves (BRASIL, 2010).

Métodos moleculares estão sendo bastante utilizados para auxiliar no monitoramento de agentes causadores de doenças dentro da cadeia de produção de frangos. Dentre os métodos moleculares destaca-se a PCR (PEREIRA & PETRECHEN, 2011).

Esta é uma técnica sensível e pode ser facilmente influenciada por alguns fatores como forma de armazenamento das amostras, quantidades de reagentes, degradação do DNA, dentre outros (FUJIMOTO et al., 2007; LIMA et al., 2007; BUTLER, 2012).

Na amplificação de DNA utilizando a PCR tornou-se mais uma alternativa para a detecção de bactérias patogênicas em alimentos. Esta técnica pode auxiliar no controle de microrganismos causadores de DTAs pois com ela é possível detectar e localizar os agentes patógenos.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo detectar *Salmonella* sp. em alimentos avícolas como carcaças, fígados, corações, moelas e em suabe de calha de evisceração e suabe de depenadeira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, foi assim denominado em homenagem a Daniel E. Salmon, que caracterizou o agente do paratifo suíno em 1885 (BRASIL, 2008).

Salmonelas são anaeróbias ou aeróbia facultativas, Gram-negativas, oxidase-negativas, não-esporogênicas, são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C, possuem o crescimento ótimo em pH entre 6,5 e 7,5, têm a forma de bastonete e medem de 0,7-1,5x2,5 µm, geralmente são móveis com flagelos peritríquios, com exceções da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* que são imóveis (FORSHELL & WIERUP, 2006).

O gênero *Salmonella* apresenta 2579 sorovares e consiste em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT & WEILL, 2007).

2.2 *Salmonella* sp. na avicultura

A salmonelose aviária é considerada a doença bacteriana de maior impacto na avicultura mundial por causar perdas econômicas e ser uma grande ameaça à saúde pública. A carcaça do frango, os ovos e seus derivados são considerados a maior fonte de infecção desse patógeno para o homem (CARDOSO & TESSARI, 2008).

Dentre os vários sorotipos descritos de *Salmonella*, *Salmonella Pullorum* (SP), agente causador da pulorose, *Salmonella Gallinarum* (SG), causador do tifo aviário, a *Salmonella Typhimurium* (ST) e *Salmonella Enteritidis* (SE), agentes causadores do paratifo aviário, são os principais agentes de importância da avicultura (CARRASCO et al., 2011).

A pandemia de *Salmonella Enteritidis* em aves de plantéis avícolas se deve pela erradicação de SG. A infecção em aves por *Salmonella Enteritidis*

possui um mecanismo de indução de resistência às outras salmonelas, pois quando este sorovar está presente em um lote de aves, outros normalmente encontrados desaparecem (SILVA & DUARTE, 2002).

As bactérias estão no trato intestinal das aves e a carne pode ser contaminada facilmente em plantas de processamento caso o abate seja inadequado e isto demonstra o quanto é importante fazer o controle da contaminação dos animais ainda na criação para minimizar a disseminação desta bactéria (CARDOSO & TESSARI, 2008).

A ingestão de alimento avícola contendo células viáveis de *Salmonella* poderá desencadear uma infecção alimentar. As bactérias aderem à mucosa do intestino humano e proliferam, colonizando-o. Em seguida, ocorre a invasão da mucosa e penetração nos tecidos e a disseminação para outros órgãos. As manifestações são por dores abdominais, vômito, diarreia e febre, os sintomas aparecem 12 a 36 horas após o consumo do alimento (FIOCRUZ, 2008).

Para o controle efetivo de salmoneloses é fundamental conhecer o perfil epidemiológico de *Salmonella* sp., entretanto esse perfil é influenciado por vários fatores, como práticas de elaboração de alimentos, padrões de higiene e saneamento, diferença entre hábitos alimentares e criação de animais (CARRASCO et al., 2011).

2.3 Legislação

Os altos índices de produtividade no setor avícola consolidou o Brasil como o maior produtor mundial de carne de frango. Este produto está presente no cardápio dos principais países, sendo assim, deve-se preocupar com a qualidade deste alimento. Os atuais elementos de inspeção sanitária instruídos no controle de riscos na indústria, aliado ao monitoramento, realizado por programa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atestam a segurança no sistema de criação da cadeia produtiva de carnes de aves, inclusive no controle da presença de resíduos de medicamentos veterinário e contaminantes, nos limites máximos estabelecidos (BRASIL, 2010).

A saúde animal também está relacionada à saúde pública, enfermidades dos animais e controle dos riscos em toda a cadeia alimentar. Para garantir a saúde animal devem-se adotar medidas de controle e erradicação das doenças (BRASIL, 2009).

O MAPA é o órgão responsável pela inspeção técnica higiênico-sanitária dos produtos de origem animal produzidos no Brasil. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) foi instituído para os estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.), em 1952 (BRASIL, 1952). Em outra vertente, há o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), criado em 1994 pelo Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura. Este programa leva em consideração a importância da produção avícola nos mercados internos e externos e a necessidade de normatização das ações de acompanhamento sanitário relacionadas ao setor. Atua na execução de ações de vigilância, profilaxia, controle e erradicação de doenças em aves como a salmonelose (BRASIL, 2009).

A Instituição Normativa nº 70 de 06 de outubro de 2003 estabelece o Programa de redução de patógenos - Monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus, o qual visa constituir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, permitindo melhor eficiência das medidas de controle (BRASIL, 2003a).

2.4 Contaminação de lotes de frangos

Apenas uma ave contaminada nos primeiros dias de vida e dentro do nascedouro pode ser o suficiente para veicular o patógeno para as outras aves do lote e para lotes vizinhos, dificultando o controle do agente (SONCINI et al., 2000).

Lotes de pintainhos recém-nascidos foram examinados por TESSARI et al. (2003). Entre os 130 lotes analisados, 32 (24,62%) apresentaram resultado positivo para *Salmonella*, isto demonstra um forte indício que tenha ocorrido transmissão vertical.

ZACAN et al. (2000) verificaram 77% de lotes positivos para *Salmonella* sp. e com isso os autores concluíram que a transmissão vertical ainda é um grande fator da introdução da bactéria em granjas.

A presença de *Salmonella* foi investigada em amostras de mecônio colhidas de 614 caixas de transporte, correspondentes a 12 lotes de pintainhas com um dia de vida. Em quatro destes lotes (129 caixas) ocorreu o isolamento de *Salmonella*, representando um percentual de 33,3 %. A avaliação da aves no primeiro dia de vida, através da detecção de *Salmonella* na caixa de transporte das aves, é um forte indício de que tenha ocorrido a transmissão vertical. Os autores afirmaram que lotes positivos para esta bactéria no primeiro dia de vida podem permanecer neste estado até a fase adulta e que lotes de aves naturalmente infectadas por este patógeno podem produzir ovos contaminados e que a susceptibilidade à *Salmonella* pode variar entre os lotes de uma mesma variedade de ave comercial (GAMA, 2001).

Ao analisar forros de caixas de transporte e pintos de corte de um dia em integrações de frangos de corte no Estado de Goiás, ROCHA et al. (2003) identificaram *Salmonella* sp. em 5,56% (1/18) dos lotes de pintos de um dia e em 55,56% (10/18) dos lotes de forro de caixas de transporte. O lote positivo em órgãos de pintos de um dia também foi positivo em forros de caixas de transporte.

No Canadá, ARSENAULT et al (2007) analisaram 82 lotes de frangos de corte, sendo 30 aves por lote. Os autores identificaram *Salmonella* em 21,2% das carcaças analisadas.

Quando investigaram a presença de *Salmonella* em lotes de poedeiras comerciais de oito empresas da região metropolitana de Fortaleza (Ceará), SALLES et al (2008) concluíram que não houve transmissão vertical e que a contaminação por este agente ocorreu após a chegada das pintainhas nas granjas.

As diversas maneiras de transmissão deste patógeno dificulta a identificação da origem da contaminação de um lote e também como ocorre a disseminação bacteriana no plantel (MENDONÇA, 2011).

2.5 Contaminação de carcaças

Dados da incidência de *Salmonella* em carcaças de frangos têm sido documentados em todo o mundo e denotam a importância e capilarização deste patógeno. Relatos da presença de *Salmonella* em cortes, carne ou produtos derivados de carne de frango está disponível em menor número quando comparado com os dados da presença deste microrganismo em frangos vivos (BORSOI et al., 2010).

Ao analisarem 47.090 amostras de carcaças de frango relacionadas com o programa América de redução de patógenos, WHITE et al. (2007) detectaram *Salmonella* em 5.251 (11,2%), sendo que 124 (2,36%) eram *Salmonella* Enteritidis.

MELDRUM & WILSON (2007) pesquisaram *Salmonella* em 877 carcaças de frangos de corte no Reino Unido e 4% destas amostras foram positivas para esta bactéria.

No Brasil, durante o período de 1999 a 2008, foram notificados 2974 surtos de toxinfecções alimentares, sendo que *Salmonella* sp. esteve envolvido em 1275 (42,9%) casos e *Salmonella* Enteritidis em 119 (4%). No mesmo período, houveram 910 (22,8%) surtos relacionados com a ingestão de ovos crus/ mal cozidos e 203 (5,1%) com carne de aves (BRASIL, 2008).

Analisaram-se 360 amostras de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo e verificaram-se a presença de *Salmonella* sp. em 7,2% das amostras (RISTORI et al., 2008).

Carcaças de frangos foram analisadas em diferentes fases de abate; Antes do chuveiro de higienização, após a depenagem; após o chuveiro de higienização; após a evisceração manual; após o chuveiro de lavagem final; na saída do pré-resfriamento. Os pontos críticos foram após a evisceração manual e após o chuveiro de lavagem final, isto pode ser devido à intensa manipulação, à provável ineficiência das lavagens intermediárias e à contaminação cruzada. Houve um declínio da contaminação na saída do pré-resfriamento, provavelmente, isto ocorreu devido às baixas temperaturas da água (4°C) e da carcaça (5°C a 10°C) e pela concentração de cloro (3,0 a 4,0 mg/mL) que são fortes inibidores bacterianos (VON RÜCKERT et al., 2009).

Das 260 carcaças analisadas por DUARTE et. al. (2009), 25(9,6%) foram positivas para *Salmonella*, sendo que o sorovar Enteritidis foi o predominante.

No estudo realizado por BORSOI et al. (2010), 180 carcaças de frangos resfriadas foram analisadas. Os resultados desta pesquisa mostrou 12,2% de ocorrência deste agente nas amostras.

2.6 Prevenção e controle da *Salmonella*

Os animais destinados à produção de carnes para consumo humano podem atuar como hospedeiros assintomáticos de patógenos entéricos importantes que representam risco de infecção para o homem, tornando um desafio para a indústria o seu controle, redução ou eliminação (SHINOHARA, 2008).

A contaminação de ovos por *Salmonella* pode ser pela infecção do tecido reprodutivo das galinhas de postura, conhecida como transmissão vertical ou infecção transovariana; ou pela transmissão horizontal, contaminação pela penetração da bactéria através da casca, quando entram em contato com as fezes após a passagem pela cloaca e também ao entrar em contato com qualquer material ou ambiente contaminado (STERZO et al., 2008).

O nível de infecção de frangos de corte, ração, água, higienização do ambiente, animais e materiais contaminados no aviário contribuem para o aumento da prevalência de *Salmonella* (REITER et al., 2007), portanto, para o controle desta DTA, a aquisição de lotes de aves livres do agente tem papel fundamental, assim como a eliminação de roedores e a limpeza e desinfecção do ambiente (SILVA & DUARTE, 2002).

A biossegurança no manejo sanitário de produtoras visa reduzir ao máximo a possibilidade de entrada de patógenos nas instalações avícolas. Portanto deve-se fazer o controle de pragas (insetos, répteis, moluscos, aves diversas), controle de fluxo de materiais, pessoas e veículos e o controle de resíduos como a cama. Programa preventivo para o controle de patógenos

também devem ser incluídos. Pode-se incluir medicações programadas, exclusão competitiva e o uso de ácidos orgânicos (MICHELETTI, 2007).

Outra medida útil para reduzir a disseminação desta enfermidade é a retirada das aves que morreram por esta doença do ambiente (SILVA & DUARTE, 2002; SANT'ANA et al., 2008).

O emprego da limpeza e desinfecção do ambiente com o uso de desinfetante também é um método muito utilizado, porém deve-se observar que a presença da matéria orgânica pode reduzir a atividade antibacteriana destes produtos (JAENISCH et al., 2010).

Mesmo com as medidas de biosseguridade preconizadas no intuito de assegurar a sanidade dos plantéis avícolas, ainda ocorrem vários surtos de Salmonelose no Brasil. Isso pode estar acontecendo devido a falta de conscientização de pessoas ligadas ou não a áreas de produção animal em relação à sanidade e devido a dificuldade de controle desta bacteriose (STERZO et al., 2008).

O controle desta enfermidade é complexo, pois os padrões diferem de uma região para outra e também devido a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas (BRASIL, 2008).

Para o monitoramento dentro dos sistemas de produção de frangos, desde a granja até a industrialização dos produtos, os métodos moleculares podem ser bastante úteis (MALDONADO, 2008).

2.7 Diagnóstico molecular aplicado à avicultura

A detecção de microrganismos em alimentos pela técnica de isolamento convencional é confiável e eficiente, porém requerem vários dias para se obter os resultados. As propriedades fenotípicas das bactérias podem não ser expressas ou serem difíceis de serem observadas e também existe a possibilidade de haver células viáveis e não-cultiváveis (MIGUEL, 2007).

Atualmente há necessidade de técnicas rápidas para detecção de microrganismos, portanto, técnicas moleculares têm sido utilizadas como triagem na microbiologia convencional (ANDRADE et al., 2010). Dentre os

métodos moleculares, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser metodologia rápida, específica e sensível (MALORNY et al., 2009).

2.7.1 PCR convencional

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é capaz de identificar o microrganismo a partir do seu material genético. O princípio deste método é replicar uma sequência alvo de DNA específica. A enzima DNA polimerase é a responsável pela amplificação e multiplicação da fita molde (MALORNY et al., 2009).

Juntamente com o DNA a ser amplificado adicionam-se os seguintes reagentes: a enzima termo-estável *taq* DNA-polimerase; dois oligonucleotídeos iniciadores, também conhecidos como *primers*, desenhados para serem complementares as sequências específicas da fita dupla e quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (SILVA et al., 2011).

Inicialmente o ácido desoxirribonucléico (DNA) é submetido a desnaturação, os iniciadores anelam-se à fita de DNA complementar e a *taq* polimerase organiza os desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) sintetizando o fragmento da dupla fita desejado (MALORNY et al., 2009). Estas etapas repetem por 30 ciclos, resultando em milhares sequências do material genético desejado (KUMAR et al., 2008).

A reação ocorre em um equipamento denominado termociclador, é onde ocorre a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA et al., 2008).

Os *amplicons*, produtos da PCR, são submetidos a eletroforese em gel de agarose, é nesta etapa que se tem a separação desses produtos de amplificação de acordo com a massa molecular. Os produtos são corados com intercalantes de DNA, tais como SYBR® safe, brometo de etídio ou GelRed™ e visualizados sob luz ultra-violeta (MALORNY et al., 2009).

2.7.2 PCR em tempo real

A reação de amplificação em tempo real permite o acompanhamento da reação em tempo real, enquanto que na PCR convencional se obtém os resultados somente no final da análise (CHEN et al., 2010).

A PCR em tempo real compreendem as etapas do PCR convencional acrescido de fluoróforo esta molécula quando excitadas por uma fonte de luz (laser), emitem uma fluorescência que é detectada por uma luz UV acoplada ao termociclador (GANDRA et al., 2008).

O sistema *Taq-Man* utiliza uma sonda (oligonucleotídeo) para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA. Esta sonda contém uma molécula *reporter* fluorescente na extremidade 5' e outra molécula *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Quando intactas, a proximidade do *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo *reporter* por meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência conhecida como FRET "Fluorescence Resonance Energy Transfer". A sonda é clivada pela *Taq* DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido, então a molécula *reporter* separa da molécula *quencher* e a luz é emitida com maior intensidade, quanto maior a fluorescência maior será a quantidade de *amplicon* produzido (MACKAY, 2007).

O *Cycle Threshold* (C_T) é o ponto que detecta o ciclo na qual a fluorescência produzida pela reação cruza a linha *Threshold*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência e é proporcional a quantidade do produto da PCR (MACKAY, 2007).

O desenvolvimento destas tecnologias de amplificação de DNA abriu enormes perspectivas para a análise de genes, diagnóstico de doenças genéticas, resistência da bactéria ao antibiótico, assim como, detectar e quantificar microrganismos em produtos derivados de aves de corte (DUFFY et al., 2012; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2013)

2.7.3 Aplicações da técnica de PCR

Ao analisar 50 amostras de carne de frango utilizando a técnica de PCR convencional, RALL et al. (2009) detectaram a presença de *Salmonella* sp. em 27 amostras (54%).

VON RÜCKERT et al. (2009) avaliaram algumas das principais fases do processo de abate de frango quanto a presença de *Salmonella* sp. em carcaças. Os autores observaram que após o chuveiro de lavagem final foi o ponto mais crítico, 30% de amostras positivas (27/90).

Em amostras de carne de frango e carne processada de frango, KANKI et al. (2009) observaram que a PCR convencional não foi capaz de detectar *Salmonella* na concentração de 10^2 UFC/mL, somente a partir de 10^3 UFC/mL que foi possível detectar este patógeno.

POSSEBON et al. (2012) relataram que o frio contínuo durante a estocagem de carcaças de frango foi capaz de reduzir as células de *Salmonella*. Quando se utilizou a PCR, 50,77% eram positivas na indústria e quando estas mesmas amostras foram estocadas a frio a porcentagem reduziu para 38,46%, decréscimo de 12,31%.

FAVIER et al. (2013) identificaram 17/115 amostras contendo cepas de *Salmonella* em carne de frango, 2/62 em miúdos de frango, 0/100 em carcaças de frango. Após a identificação com a PCR os autores também aplicaram uma outra técnica molecular, PFGE e revelaram que houve semelhança do perfil genético entre cada sorotipo de *Salmonella*.

Os resultados dos estudos de GARRIDO et al. (2013) demonstram alta sensibilidade da técnica de PCR em tempo real, ao ser capaz de detectar 3 UFC de *Salmonella* em 25g de amostra de carne frango. CHEN et al. (2010) contaminaram artificialmente, amostras de líquido de ovos e carne de frango e relataram que o PCR em tempo real foi bastante sensível ao detectar 3 UFC/amostra e 5 UFC/amostra nos respectivos produtos.

2.8 Interferências na análise de PCR

Existem vários fatores que afetam a interpretação e comparação dos resultados da PCR, como: a qualidade de todos os seus componentes, incluindo DNA-molde originado do preparo da amostra para PCR; as condições da reação; o sistema de detecção; o equipamento utilizado; o ambiente (temperatura, umidade, limpeza química e microbiológica) e a prática do analista (FREITAS et al., 2006).

A especificidade da análise é afetada por componentes não desejados, o que resultam em falso-negativos. A contaminação cruzada entre diversas etapas da PCR pode levar ao aparecimento de falsos positivos. Quando ocorre a contaminação por *amplicons* do material já amplificado, esta contaminação pode ser carregada na manipulação das amostras pelas luvas, pelas vidrarias, pelos instrumentos e até mesmo pelos *Kits* (MALDONADO, 2008), por isso é importante enfatizar o uso de materiais descartáveis em todas as etapas dos procedimentos e atestar à negatividade da PCR em todos os controles negativos (FUJIMOTO et al., 2007).

A concentração de magnésio elevada diminui a especificidade da reação e favorece a formação de dímeros entre os iniciadores, baixas concentrações desta substância aumentam a especificidade, mas diminuem o rendimento. Especificamente, considerando a PCR em tempo real, o próprio programa já analisa a probabilidade de concentração destes analitos selecionando o melhor sistema analítico (MIGUEL, 2007).

Resultados falso-negativos tornam-se um perigo para a população, enquanto que resultados falso-positivos requerem um esclarecimento dos resultados presuntivos por intermédio de um novo teste na amostra (FREITAS et al., 2006).

Pode ocorrer a associação dos iniciadores com sequências de DNA semelhante com o DNA alvo e isto se traduzem em ampliações não específicas que levam aos resultados falsos positivos. Os *primers* também podem fazer ligações incompletas, deixando a região terminal do DNA molde livre. Salienta-se o fato de que a ocorrência de ligações não específicas aumenta quando se usam iniciadores degenerados (MIGUEL, 2007).

Substâncias inibidoras da *Taq* DNA polimerase podem gerar resultados falso-negativo, portanto destaca-se a importância da lavagem exaustiva do DNA para eliminar estas substâncias (LIMA et al., 2007).

Efeito estocástico, efeito estatístico de amostragem com baixo número de cópias, pode causar variabilidade significativa nos resultados dos ensaios. O tamanho do DNA molde também interfere na eficiência da técnica. O rendimento da reação diminui e aumenta-se o efeito estocástico se o tamanho da cadeia da dupla hélice for superior a três mil pares de base. O tamanho deve ser próximo de dois e três mil pares de base de comprimento (MIGUEL, 2007).

A presença de inibidores na amostra de DNA como azul de bromofenol, heparina, detergentes iônicos, fenol, xilenocianol vetam a reação de PCR. Alguns fatores podem impedir a clivagem do DNA sintetizado como o excesso de glicerol na reação e os inibidores da atividade das enzimas de restrição, como por exemplo, o sal em excesso na reação (SCHAEFER, 2006).

São muitos os fatores que podem causar a degradação do DNA. Ao congelar e descongelar as amostras forma-se cristais de gelo que irão fragmentar o DNA. Manusear a amostra à temperatura ambiente por muito tempo também pode danificar o material genômico. Com a purificação inadequada do DNA, algumas enzimas degradantes podem permanecer e degradar a dupla hélice. Nucleases presentes na pele humana também podem causar a degradação do produto da amplificação, portanto ressalta-se a importância de se utilizar luvas para o preparo da reação (BUTLER, 2012).

A degradação do DNA pode ser devido a ação de DNases de origem bacteriana e também pela presença de traços de fenol na amostra. Alguns microrganismos têm a capacidade de produzir enzimas termoestáveis podendo degradar os produtos da amplificação (VICTÓRIA, et al., 2011).

Presença de alguns componentes da matriz alimentar, tais como lipídeos, sais e proteínas, interferem na otimização das reações de PCR, obtendo-se resultados falsos negativos (MALORNY et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e análises bacteriológicas convencionais

As amostras foram compostas por carcaças (75), coração (45), moela (45), fígado (45), suabes de calha de evisceração (45) e suabes de depenadeira (45), sendo que todas as amostras foram obtidas em três abatedouros de aves, localizados no estado de Goiás.

De cada carcaça foram retiradas 25 gramas de pele, às quais foram adicionados 225 mL de água peptonada 1%.

Para as vísceras, a amostra foi pesada individualmente e calculada a quantidade de água peptonada 1% a ser acrescentada para que fosse mantida a proporção 1:10.

Os suabes, transportados em meio Cary Blair, foram transferidos para 9 mL de água peptonada 1% e incubados a 37°C por 18 – 24 horas.

Após adição de água peptonada as amostras de carcaças e vísceras foram homogeneizadas em equipamento próprio, por um minuto e incubadas a 37°C por 18 – 24 horas.

Após o período de incubação seis alíquotas de 1mL da água peptonada foram transferidas para tubos tipo eppendorf e mantidos sob temperatura de congelamento, -18°C, para posterior realização dos VIDAS e análises de PCR. Simultaneamente uma alíquota de 1mL foi transferida para o caldo Tetrionato (TT) e 0,1mL para o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), dando sequência ao isolamento convencional bacteriano. As análises seguiram o disposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003b).

Após incubação dos caldos seletivos, uma alíquota de cada caldo foi transferida para placas de Petri contendo ágar verde brilhante com sulfa (BGS) e ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4). Realizou-se a semeadura em superfície por esgotamento. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, três colônias suspeitas de *Salmonella* sp, incolores ou de cor rosada no ágar BGS e amarelas com centro negro no ágar XLT4, foram repicadas para ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubadas a 35°C, por 24 horas.

Dos tubos de ágar tríplice açúcar ferro (TSI) que apresentaram reações compatíveis com as descritas para o gênero *Salmonella* sp, seguiu-se a marcha analítica com as provas bioquímicas, teste da urease, teste de indol, teste de vermelho de metila, teste do malonato e o teste lisina descarboxilase.

Após a leitura dos resultados apresentados pelas provas bioquímicas, procedeu-se o teste sorológico. Isolados compatíveis com o gênero foram semeados em ágar nutriente e encaminhados ao Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, para sorotipificação.

3.2 ELFA

Para o ensaio de triagem com equipamento mini-VIDAS, as amostras acondicionadas em água peptonada 1% e congeladas, foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente duas horas como tempo máximo. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para 10 mL do caldo SX2 e incubadas em banho-maria a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Após o período de incubação, dois mL do caldo SX2 foram transferidos para tubo estéreis, foram aquecidos em banho-maria a 95 a 100°C durante 15 minutos, em seguida arrefecidos, homogeneizados e alíquotas de 0,5mL foram transferidas para os poços-amostra da barrete VIDAS[®] e analisadas no equipamento mini-VIDAS[®], pelo Kit VIDAS[®]-SLM (Mini-VIDAS[®], BIOMÉRIEUX, 2010), com resultados expressos por positivo ou negativo.

3.3 Extração do DNA

A metodologia de extração do DNA seguiu uma adaptação do protocolo descrito por FLÔRES et al.(2001).

As alíquotas de 1 mL da água peptonada 1% foram descongeladas, em um recipiente e utilizadas para a extração do DNA genômico. Centrifugou-se a alíquota, a 5000 rpm por 4 minutos, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* em 1 mL de TE (10 mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8), homogeneizou-se no vórtex por 10 segundos, centrifugou-se duas vezes a 5000 rpm por 4

minutos, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* em 1 mL de TE, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e incubou-se em banho-maria a 95°C por 10 minutos, em seguida centrifugou-se a 5000 rpm por 20 segundos.

Os sobrenadantes contendo o DNA foram mantidos congelados à -20°C até a realização das análises.

3.4 PCR convencional

Foi estabelecido o volume de 50 µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*PCR buffer 10x Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 50 mM (*Invitrogen*); 1 µL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µL (10 pM) do iniciador sense, 0,5 µL (10 pM) do iniciador anti-sense, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 5 µL do eluato de DNA genômico da amostra.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado para um ciclo inicial (*hot start*) de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos repetidos de 94°C por 40 segundos, temperatura de anelamento (*Ta*) de 55°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto. A programação era finalizada com 5 minutos a 72°C para maximizar o processo de extensão. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *iroB*, primer 1 F: 5'-TGCGTATTCTGTTTGTCGGTCC-3' e primer 2 R: 5'-TACGTTCCCACCATTTCTTCCC-3', que delimitam um fragmento de 606 pares de base (pb) (BÄUMLER et al., 1997).

Para a análise dos fragmentos, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,2% em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (pH 8,0). O gel foi submetido à voltagem constante de 90V durante 60 minutos.

Em seguida, o gel foi corado por imersão em brometo de etídio durante 10 minutos e submerso em água por 5 minutos para a retirada do excesso do brometo. Os resultados foram visualizados em transiluminador ultra-violeta. As bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de base. Cepa de *Salmonella* Enteritidis foi utilizada como controle positivo e água ultra pura como controle negativo.

3.5 PCR em tempo real

Os reagentes utilizados foram 4,6 µL de água ultra pura; 10 µL de TaqMan® master mix(1x); 1 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores (50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 30mM); 0,4 µL na concentração de 10mM da sonda alvo; 2 µL de IPC (10x); 0,4 µL de 50x Exogenous e 2 µL de solução de DNA, totalizando 20 µL (CALVÓ et al., 2008).

A amplificação foi realizada em termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 60°C por 30 segundos (pré-PCR), 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial); 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento/extensão); e 60°C por 30 segundos (pós-PCR). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *bipA*: SAL1410f F: 5'-GGTCTGCTGTACTIONCCACCTTCAG-3' e SAL1494r R: 5'-TTGGAGATCAGTACGCCGTTCT-3' e a sonda foi a SAL1441pr 6FAM-TTACGACGATATTCGTCCGGGTGAAGTC-TAMRA (CALVÓ et al., 2008).

Como usual ao ensaio, para atestar o bom desempenho da PCR, em todas as reações realizadas, utilizou-se o reagente bloqueador de IPC (*negative control blocked IPC*, Life®). Cepa de *Salmonella* Enteritidis foi utilizada como controle positivo e água ultra pura como controle negativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 300 alíquotas analisadas, detectou-se *Salmonella* sp. em alíquotas classificadas como negativas e positivas ao isolamento bacteriano convencional, como pode ser visto nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 – Frequência de *Salmonella* sp. por identificação (isolamento bacteriano convencional - IBC) e detecção de em caldo de pré-enriquecimento congelado pelos ensaios VIDAS[®]-SLM, PCR em tempo real (PCR – rt) e no PCR convencional (PCR – c)

Resultado	IBC	VIDAS [®] -SLM	PCR - c	PCR - rt
Positivo	21/300 (7%)	18/300 (6%)	5/300 (1,7%)	22/300 (7,3%)
Negativo	279/300	282/300	295/300	278/300

Observou-se variabilidade entre os ensaios para as respostas, o que necessariamente não predispõe a definir qual o melhor ensaio e ressalta-se não ser este o objetivo deste estudo. Os diferentes percentuais observados denotam particularidades quanto à recuperação de bactérias em caldo de pré-enriquecimento utilizado.

KANKI et al.(2009) avaliaram o efeito da preparação de amostras em função do ensaio empregado para detecção de *Salmonella* sp. em carne de aves, em água peptonada (caldo de pré-enriquecimento), no entanto eles avaliaram ainda o uso de massagem manual, emprego de *stomacher* e amostras em caldo sem o processo de homogeneização; os autores também não congelaram os caldos. Eles identificaram que houve diferença entre método de cultura e PCR convencional. Sendo que a homogeneização por *stomacher* permitiu maior percentual de positividade para cultura, não sendo observado correspondência ao ensaio por PCR. Os autores justificaram que o uso de *stomacher* pode ter contribuído para maior exposição de componentes presentes na amostra que inibiram a atividade da DNA polimerase, para caldos com menor quantidade de *Salmonella*.

Para o presente estudo, todas as amostras de alimentos passaram pelo processo de homogeneização por trituração como *stomacher*, o que não exclui

a possibilidade de haver interferentes próprios das amostras favorecendo a divergência entre resultados por IBC e PCR convencional.

TABELA 2 – Compatibilidade entre presença (+) ou ausência (-) para os ensaios VIDAS[®]-SLM, PCR em tempo real (PCR – rt) e PCR convencional (PCR – c), em caldos positivos pelo IBC e seus respectivos sorovares

Amostra Positiva IBC	Sorovares /fórmula antigênica identificados*	VIDAS [®] - SLM	PCR - rt	PCR - c
		16/21	7/21	1/21
Carcaça	Typhimurium	-	-	-
Carcaça	Infantis	+	-	-
Carcaça	Livingstone, Mbandaka	+	-	+
Carcaça	Saint Paul, Mbandaka, Typhimurium	+	-	-
Carcaça	Schwarzengrund	-	-	-
Carcaça	Enteritidis	-	-	-
Carcaça	Schwarzengrund	+	+	-
Coração	Anatum	-	-	-
Coração	Cerro	+	-	-
Coração	Cerro, Infantis, Livingstone	+	-	-
Coração	Typhimurium	+	+	-
Moela	Cerro, Infantis, Livingstone	+	-	-
Moela	Cerro	+	-	-
Moela	Cerro, Thyphimurium	+	-	-
Moela	Cerro	+	+	-
Fígado	Schwarzengrund	+	+	-
Fígado	Schwarzengrund	-	-	-
Sb.ev**	Schwarzengrund	+	+	-
Sb. ev**	Livingstone, Ohio	+	-	-
Sb.dp***	Schwarzengrund, O:9,12	+	+	-
Sb.dp***	Typhimurium	+	+	-
Percentuais compatíveis entre ensaios e IBC		76,2%	33,3%	4,8%

* sorotipificação feita pelo Laboratório Referência FIOCRUZ

** Sb.ev = suabe de evisceração; *** Sb.dp = suabe de depenadeira

Cabe ressaltar que o resultado do VIDAS[®]-SLM não determina o fim da análise e sim que, frente ao resultado positivo, deve haver sequência analítica para isolamento, no entanto, isso cabe às amostras consideradas positivas. Portanto, convém esclarecer que o tempo demandado entre incubação e resultado é relativamente curto, o que dá boa margem de segurança para eventos de necessidade de rápida resposta, como para indústrias, por exemplo.

TABELA 3 – Caldos de pré-enriquecimento negativos ao isolamento bacteriano e positivos no VIDAS-SLM, PCR em tempo real e/ou no PCR convencional.

Código amostra	Categoria	Resultados presença (+) ou ausência (-)			
		IBC	VIDAS	PCR rt	PCR c
1	Carcaça	-	-	+	-
2	Coração	-	+	-	+
3	Coração	-	-	+	-
4	Coração	-	-	+	+
5	Coração	-	-	+	-
6	Coração	-	-	+	-
7	Fígado	-	+	+	+
8	Fígado	-	-	+	+
9	Fígado	-	-	+	-
10	Moela	-	-	+	-
11	Moela	-	-	+	-
12	Moela	-	-	+	-
13	Moela	-	-	+	-
14	Moela	-	-	+	-
15	Sb. ev**	-	-	+	-
16	Sb. dp***	-	-	+	-
Total 16/279			2 (0,7%)	15 (5,4%)	4 (1,4%)

* ao final da sequência analítica, não houve associação ao gênero *Salmonella* sp. frente à prova sorológica; ** Sb.ev = suabe de evisceração ; *** Sb.dp = suabe de depenadeira

Observando as Tabelas 2 e 3, percebe-se pouca diferença percentual entre IBC e VIDAS-SLM, assim, a aplicabilidade do método de triagem pode satisfazer a necessidade de diagnóstico rápido da indústria e de órgãos de fiscalização.

Sob outro parâmetro de avaliação, os métodos moleculares explicitaram resultados com alta variabilidade quando tomou-se por apoio o IBC. CASTAGNA et al. (2005) concluíram que o enriquecimento seletivo pode contribuir significativamente para a detecção do bactéria alvo, quando comparou a execução da PCR convencional em comparação ao isolamento bacteriano convencional, porém não houve a descrição de congelamento prévio como neste estudo, corroborando com as descrições de VIEIRA et al. (2007) quando afirmaram que o congelamento para a estocagem das amostras é um fator de interferência na integridade do DNA.

Por outro lado, a PCR em tempo real empregada, com seleção dos *primers* e sonda preconizados por CALVÓ et al. (2008), vinculados ao gene *bipA*, é considerada uma sequência específica, com ampla aplicação ao gênero, porém com exclusão de alguns sorovares. Neste estudo, observou-se ausência de reação para os sorovares Anatum, Infantis, Livingstone, Mbandaka, Ohio e Saint Paul. Porém cabe esclarecer que pode ter ocorrido uma associação de fatores, em que novamente ressurgem o efeito negativo do congelamento prévio e o fato de que os sorovares não constituem cepas referência e sim isolados com procedência do campo, o que pode alterar a eficiência da reação em comparação aos estudos de CALVÓ et al. (2008).

Além disso, deLIVRON & ROBINSON (2008) identificaram alta capacidade de alteração do gene *bipA*, quando a bactéria está em condições desfavoráveis no ambiente, pela expressiva associação a elementos proteicos (ribossomos) que poderiam mascarar a reação; fato que pode ter ocorrido neste estudo.

SANTOS et al. (2001) afirmaram que o pré-enriquecimento por água peptonada a 1% combinado à extração de DNA por fenol clorofórmio, potencializariam a detecção de *Salmonella* em carnes experimentalmente contaminadas. No presente estudo, a água peptonada foi empregada, porém a metodologia de extração foi divergente e o tempo decorrido entre o pré-

enriquecimento e a efetiva extração do DNA pode ter contribuído para a menor qualidade da alíquota. Ainda, acredita-se que o congelamento aplicado aos caldos, em particular, pode ter sido responsável pela dificuldade de identificação do DNA de salmonelas presentes.

Por outro lado, KONGMUANG et al. (2008) descreveram que interferentes podem alterar as reações de extração, o que permitiria a perda de bactérias, durante os procedimentos. O protocolo empregado neste estudo é considerado de boa aceitação. No entanto, é possível que outro método de extração pudesse contribuir para resultados menos discordantes, baseando na fase de enriquecimento seletivo prévio (TASKILA et al., 2012) e tratamento adequado da amostra. Apesar de que alguns estudos apontam para utilização de ensaios moleculares sem enriquecimento, como tendência.

ANDREATTI FILHO et al. (2011) mencionaram que a presença de partículas das reações ou outras substâncias provenientes das amostras podem interferir na obtenção do DNA. Os autores observaram que a incorporação de detergentes melhorou significativamente a extração de amostras de campo e conseqüentemente aumentou o percentual de positividade.

Em 2013, JENSEN et al. publicaram um estudo em que a PCR em tempo real não sobrepujou a sensibilidade de detecção frente ao isolamento bacteriano convencional para amostras de fezes de bovinos. Este dado é importante por tratar-se de amostras com alta contaminação e por conseqüência de alta competição no meio, o que pode ter desfavorecido a sensibilidade do método molecular pela rápida degradação do DNA alvo. Situação similar de contaminantes acompanhantes pode ter ocorrido no atual estudo. Pelo exposto, acredita-se que possivelmente os resultados incompatíveis para detecção dos sorovares previamente identificados, também podem estar relacionados à extração adotada neste estudo.

SOMMER et al. (2012) ao analisarem tempos de armazenamento diferentes (tempo zero e sete dias), considerando os métodos de extração, verificaram que amostras frescas relacionaram-se ao maior percentual de positividade, em detrimento de amostras submetidas à secagem por sete dias.

Na presente pesquisa, *Salmonella* sp. foi detectada por PCR em tempo real em 22 caldos (7,3%), havendo a presença da bactéria em todas as categorias amostrais avaliadas (Tabela 4). Ainda assim, mesmo havendo a fase de pré-enriquecimento como recomendado por WHYTE et al. (2002) e SUO et al (2010) com o objetivo de favorecer a detecção, cabe salientar que este método não demonstra viabilidade celular, valendo-se da detecção de material genético, indicando que o agente está ou esteve presente no substrato, podendo ou não estar viável quando da sua detecção.

TABELA 4: Amostras positivas à PCR em tempo real separadas por categoria

Categoria	Nº de amostras positivas (%)
Moela	6/45 (13,3%)
Coração	5/45 (11,1%)
Fígado	4/45 (8,9%)
Carcaças	2/75 (2,7%)
Suabes de depenadeiras	3/45 (6,7%)
Suabes de calhas de evisceração	2/45 (4,4%)
TOTAL	22/300 (7,3%)

Por estes resultados, pode-se observar que o patógeno foi detectado em todas as categorias de amostras, com expressiva presença em vísceras comestíveis destinadas ao consumo humano, o que pode sugerir risco à saúde do consumidor pelo fato de serem alimentos que não são submetidos à ação de cozimento adequado.

Outro item relevante refere-se às depenadeiras que são equipamentos de grande contato com todas as aves do lote e de lotes subsequentes. A detecção da bactéria neste local permite conjecturar a provável disseminação da bactéria entre carcaças, principalmente quando salienta-se a capacidade de formação de biofilme bacteriano pelo gênero.

Quanto às calhas de evisceração, usualmente não há contato entre o alimento destinado ao consumo e mesas, no entanto, há resíduos destinados à

graxaria e contato manual dos colaboradores. A presença de *Salmonella* neste equipamento contribui para provável disseminação da bactéria no ambiente.

Pelas características do patógeno, considerando sua ecologia e os procedimentos existentes no interior dos abatedouros quanto às operações de abate, destinação de vísceras não comestíveis, resíduos, tratamento de resíduos, higiene e desinfecção há grande probabilidade do patógeno ser eliminado. No entanto, é possível ocorrer recontaminação do ambiente de abate, o que acentua a perpetuação de *Salmonella* sp. e compõe necessidade de investigar periodicamente a presença da bactéria nas instalações.

Os recursos da biologia molecular são extremamente úteis ao monitoramento dentro dos sistemas de produção, desde a granja até a industrialização dos produtos, quando se tem por objetivo acompanhar a ocorrência do agente e principalmente, quando se avalia o tempo decorrido para análise e sua representatividade à indústria e órgãos de fiscalização. Soma-se a este argumento, as descrições de MALDONADO (2008) quanto à agilidade, elevada sensibilidade, capacidade da análise simultaneamente de um grande número de amostras e o curto tempo de ensaio como grandes vantagens para que a PCR, principalmente em tempo real, seja utilizada pelas indústrias no rastreamento de patógenos presentes em todas as etapas e elos da cadeia, como forma de estabelecer controle e minimizar riscos pela exposição ao patógeno à saúde pública.

Segundo GRIMONT & WEILL (2007), em documento oficial do Instituto Pasteur, novas fórmulas antigênicas de *Salmonella* e novos sorovares foram identificados. Entre 2003 e 2007, relatou-se a caracterização de 70 novas fórmulas antigênicas e a diversidade genética dos próprios sorovares (considerando variações para fagotipos e ribotipos) conforme detalhamento de GUIBOURDENCHE et al. (2010). Provavelmente isto esclarece a ausência de reação para alguns sorovares identificados nos caldos avaliados, não relacionados aos estudos de BÄUMLER et al. (1997) e CALVÓ et al. (2008).

Em amostras observou-se resultado negativo para o isolamento bacteriano convencional e positivo para a PCR. De acordo com FLORESTA (2006) isto pode ter acontecido devido ao fato das bactérias entrarem em estado fisiológico denominado viável não cultivável (VNC), no qual as células

mantêm atividade metabólica, mas não são cultiváveis pelos métodos tradicionais disponíveis.

O baixo número de células também pode explicar tais alterações entre resultados. MYINT et al. (2006) esclareceram que a associação de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo acentuam a capacidade do ensaio em detectar baixa quantidade de células do microrganismo alvo, quando utilizada a PCR.

Outra hipótese deste acontecimento relaciona-se ao isolamento bacteriano fundamentado nas propriedades fenotípicas do gênero bacteriano. Cabe salientar que em ocasiões específicas, tais propriedades não se expressam ou podem ter sua classificação dificultada (MARIN et al., 2006).

A água peptonada 1% obtida no pré-enriquecimento também foi utilizada para a extração de DNA nos estudos realizados por SANTOS et al. (2001). Ao inocularem artificialmente *Salmonella* sp. em carnes de frango, estes autores observaram 100% de eficiência no método de análise, portanto este caldo não foi um fator limitante. Para ÁVILA et al. (2012) este meio de cultura possibilita o crescimento indiscriminado de outras bactérias presentes na amostra, o que decorre em maior competitividade entre os microrganismos; tal fato pode ter influenciado a detecção de *Salmonella* desta pesquisa. Além disso, DNA e células de outros organismos (microbiota competitiva) também afetam a sensibilidade e especificidade da PCR (MALDONADO, 2008).

RISTORI et al. (2008) relataram que a ocorrência e quantificação de *Salmonella* nas aves podem variar de acordo com o manejo durante a criação, condições de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças.

Apesar de todos os esforços das indústrias avícolas no que diz respeito à adoção de medidas de biossegurança e programas de garantia de qualidade, não é possível eliminar patógenos durante a cadeia de processamento de frangos e sim reduzir.

Porém, a redução dos níveis de contaminação da carne de frango é importante para diminuir a prevalência de doenças veiculadas por alimentos, além de garantir a qualidade e inocuidade dos produtos de frango aos consumidores. Conforme GEORGIADIS et al. (2010), cabe considerar a aplicação de recursos diagnósticos que permitam rapidez, sensibilidade e

especificidade analíticas, como ferramentas laboratoriais à segurança alimentar.

5 CONCLUSÕES

Detectou-se *Salmonella* sp. em carcaças e vísceras comestíveis.

Salmonella sp. está presente em abatedouros de aves.

O ensaio de PCR em tempo real é um bom recurso diagnóstico para análise de rotina relacionadas a alimentos e ao ambiente de abate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E., CANELO, A., DÍAZ-VEGA, C., CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. **Food Control**, Guildford v.30, p. 227 e 234. 2013.
2. ANDRADE, R.B.; GEMELLI T.; DALL ONDER L.P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A.A.L.; BRITO B.G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, 2010.
3. ANDREATTI FILHO, R. L.; GONÇALVES, G. A. M.; OKAMOTO, A. S.; LIMA, E. T. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.1, p.115--119, 2011.
4. ÁVILA, L.G., SILVA, D.G., J.J. FAGLIAR. Comparação dos caldos selenito cistina, tetracionato Muller-Kauffmann e Rappaport-Vassiliadis no isolamento de *Salmonella* Typhimurium . **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.3, p.773-775, 2012.
5. ARSENAULT, J., LETELLIER, A., QUESSY, S., BOULIANNE, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broilerchickens slaughtered in Quebec, Canada. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 8, p. 1820-1828, 2007.
6. BÄUMLER, A. J., HEFFRON, F., REISSBROD, T. R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington. v. 35, n. 5, p.1224-30, 1997.
7. BELUSSO D., HESPANHOL A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percursos – NEMO**, Maringá, v. 2, n. 1 , p. 25-51, 2010.
8. BORSOI, A., MORAES, H. L. S., SALLE C. T. P., NASCIMENTO V. P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.11, p.2338-2342, 2010.
9. BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União, Brasília, seção I, p. 10785, 07 jul. 1952.

10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, 10 outubro de 2003. **PROGRAMA DE REDUÇÃO DE PATÓGENOS MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO - CONTROLE DE *Salmonella* sp. EM CARÇAÇAS DE FRANGOS E PERUS.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 out. 2003 a. Seção 1, p. 9.

11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Dispõe sobre os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003b. Seção 1, p. 14.

12. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos.dta.pdf> Acesso em 23/08/2012

13. BRASIL. **Análise Epidemiológica dos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008b.

14. BRASIL. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. 2008. P. 167

15. BRASIL. Manual de legislação – **Programas nacionais de saúde animal do Brasil.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, p. 441. 2009.

16. BRASIL. **A força da agricultura 1860 – 2010.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2010.

17. BUTLER, J. M. **Degraded DNA.** p. 293-309. In___: Advanced Topics in Forensic DNA Typing: methodology. p. 680, ed. Academic Press, China, 2012.

18. CALVÓ, L., MARTINEZ-PLANELLAS, A., PARDOS-BOSCH, J., GARCIA-GIL, L. A New Real-Time PCR Assay for the Specific Detection of *Salmonella* sp. Targeting the bipA Gene. **Food Analytical Methods**, New York, n. 1, v. 4, p.236-242. 2008.

19. CARDOSO A.L.S.P. & TESSARI E.N.C. *Salmonella* na segurança de os alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, 2008.

20. CARRASCO, A. O. T., ISSAKOWICZ, J. C., MORAIS, M. T. G. F., FATORETTO, L. A., PANDOLFI, J. R. C., SILVA, L. C., PINTO, A. A. **Levantamento Sorológico de *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.13, n.1, p.23-27. 2011.
21. CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. , n. 36, p. 373-377, 2005.
22. CHEN, Z. B, WANG, M. L, BARKLEY, N. A., PITTMAN, R. N. A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. **Plant Molecular Biology Reporter**, Urbana, v. 28, p. 542–548, 2010.
23. deLIVRON, M. A.; ROBINSON, V. L. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium BipA Exhibits Two Distinct Ribosome Binding Modes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.190, n. 17, p. 5944-5952, 2008.
24. DUARTE, D. A. M., RIBEIRO, A. R., VASCONCELOS, A. M. M., SANTOS, B. S., SILVA, J. V. D., ANDRADE, P. L. A., FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 569-573. 2009.
25. DUFFY, L. L., DYKES, G. A., FEGAN, N. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia. **Food Research International**, Barking, v.45, p. 770–779. 2012.
26. FAVIER, G. I., ESTRADA, C. S. M. L., OTERO, V. L., ESCUDERO, M. E. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. **Food Control**, Guildford v.29, p.49-54. 2013.
27. FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; SANTOS, K. L. R.; PONTES, A. P.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Métodos de extração de DNA para detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, Porto Alegre, v. 31, p. 317-318, 2001.
28. FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado Viável não Cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli*.** 2006. 72p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.

29. FORSHELL, L. P., WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p. 541-554, 2006.
30. FREITAS, E. I., LEMOS, A. A., MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, p.1073-1083, 2006.
31. FUJIMOTO, L. B. M., SALEM, J. I., OGUSKU, M. M. FERREIRA., L. C. L. Avaliação do protocolo PCR4 de Marchetti em tecidos parafinizados para o diagnóstico da tuberculose cutânea e ganglionar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 195-201, 2007.
32. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ. **Doença de transmissão alimentar: aspectos clínicos, coleta e transporte de material**. 33p. 2008.
33. GAMA, N. M. S. Q. **Salmonella sp. em aves de postura comercial**. Jaboticabal, São Paulo, 2001. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
34. GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Science, Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
35. GARRIDO, A., CHAPELA, M., ROMÁN, B., FAJARDO, P., LAGO, J. VIEITES, J. M, GABADO, A. G. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. **Food Control**, Guildford v. 30, p.76-85. 2013.
36. GEORGIADIS, S., PILGER, D., A., PEREIRA, F. CANTARELLI, V. V. Avaliação molecular de norovírus em pacientes com gastroenterite aguda. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.43, n.3, p.277-280, 2010.
37. GRIMONT, P. A. D., WEILL F., X. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. **WHO collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. 9 ed. Paris, Pasteur Institute, p. 166, 2007.
38. GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X.; Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n.161, p. 26-29, 2010.
39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Estatística da produção pecuária**. p.35, 2012.

40. JAENISCH, F. R. F., KUCHIISHI, S. S., COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.384-388, fev, 2010
41. JENSEN, A. N.; NIELSEN, L. R.; BAGGESEN, D. L. Use of real-time PCR on faecal samples for detection of sub-clinical *Salmonella* infection in cattle did not improve the detection sensitivity compared to conventional bacteriology. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 163, p. 373-377, 2013.
42. KANKI, M.; SAKATA, J.; TAGUCHI, M.; KUMEDA, Y.; ISHIBASHI, M.; KAWAI, T.; KAWATSU, K.; YAMASAKI, K.; MIYAHARA, M. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. **Food Microbiology**, v. 26, p. 1-3, 2009.
43. KONGMUANG, U.; LUK, J. M. C.; LINDBERG, A. A. Comparison of three stool processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2 and D by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 3.072-3.074, 1994.
44. KOTTWITZ, L. B., BACK, A., LEÃO, J. A. ALCOCER, I., KARAN, M. OLIVEIRA, T. C. R. M. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.2, p. 496-498, 2008.
45. KANKI, M. SAKATA, J., TAGUCHI, M., KUMEDA, Y., ISHIBASHI, M., KAWAI, T., KAWATSU, K., YAMASAKI, W., INOUE, K., MIYAHARA, M. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 1–3, 2009.
46. KUMAR, R., SURENDRAN, P. K., THAMPURAN, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford n. 46, v. 2, p. 221-226, 2008.
47. LIMA, K. V. B., LOPES, M. L., LOUREIRO, E. C. B. COSTA, M. M. CARDOSO, N. C., LIMA, G. L. F., SOUSA, M. S. *Nested*-PCR do gene que codifica o antígeno b aplicada ao diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n.2, p.212-215, 2007.
48. MACKAY, I. M. **Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization**. Horizon Scientific Press, 2007 - 454 páginas.
49. MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* sp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado**

municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. 2008. 75p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo.

50. MALORNY, B., HUEHN, S., DIECKMANN, R. KRÄMER, N., HELMUTH, R. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification os *Salmonella* in Food and Feeding Stuff. **Food Analytical Methods**, New York, v. 2, p. 81-95, 2009.

51. MARIN, V.A. et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

52. MELDRUM, R. J., WILSON, I. G. *Salmonella* and *campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 80, p. 1937-1939, 2007

53. MENDONÇA, E. P. Disseminação de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva do frango de corte. 2011. 84p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia.

54. MICHELETTI, A. Manejo reprodutivo e sanitário de reprodutoras pesadas. **Revista brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 318-321. 2007.

55. MIGUEL, A. L. C. S. F. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogênicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL.** 2007. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Universidade Técnica de Lisboa.

56. MOREIRA, A. P. O. **Persquisa de *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza-CE.** 2002. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará.

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

58. PEREIRA, R. E. P., PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, p. 1- 12, 2011.

59. POSSEBON, F.; COSTA, L. F. Z. P.; YAMATOG, R. S., RODRIGUES; M. V., SUDANO, M. J.; Pinto J. P. A. N. A refrigeração no diagnóstico de *Salmonella* spp. utilizando o método microbiológico tradicional e reação em

cadeia da polimerase em carcaças de frango. **Ciências Rural**, Santa Maria, vol.42, n.1, p. 131-135, 2012.

60. RALL, V. L. M., MARTIN, J. G. P., CANDEIAS, J. M. G., CARDOSO, K. F. G., SILVA, M. G., RALL, R., ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

61. REITER, M. G. R., FIORESE, M. L., MORETTO, G., LOPEZ, M. C., JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n.7, p. 1723-1725, 2007.

62. RISTORI, C. A., BERGAMINI, A. M. M., ROWLANDS R. E. G., LOPES, G. I. S. L., PAULA, A. M. R., OLIVEIRA, M. A., RIBEIRO, E. G. A., TORRE, J. C. M. D., PRADO, S. P. T., YOSHIDA, J. T. U., RODRIGUES, R. S. M., TAHA, O. G., MARSIGLIA, D. A. P., JAKABI, M. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, n. 52, p. 16-19, 2008.

63. ROCHA, P.T., MESQUITA, A.J., ANDRADE, M.A., LOULY, P.R., NASCIMENTO, M.N. *Salmonella* sp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.6, p.672-676, 2003.

64. SANT'ANA, T. M., MONTEIRO, M. E. Z., BIGNARDE, J. M. P., UEDA, F. S., PENHA, G. A., PEREIRA, R. E. P. Salmonelose em animais silvestres e exóticos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 6, n. 11, p.1-7, 2008.

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

66. SALLES, R. P. R.; TEIXEIRA, R. S. C.; SIQUEIRA, A. A.; SILVA, E. E.; CASTRO, S. B.; CARDOSO, W. M. Monitoramento bacteriológico para *Salmonella* spp. em poedeira comercial na recria e produção de empresas avícolas da região metropolitana de Fortaleza, CE, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 2, p. 427-432, 2008.

67. SCHAEFER, R. **Técnicas em biologia molecular**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 24p. Concórdia, SC 2006.

68. SILVA, I.M.M., EVÊNCIO-NETO, J., SILVA, R.M., LUCENA-SILVA, N., MAGALHÃES, J., BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de**

Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo horizonte, v.63, n.2, p.333-339, 2011

69. SILVA, E. N., DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* em aves: Restropectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas. v. 4, nº 2, p. 85-100. 2002.

70. SHINOHARA, N. K. S., BARROS, V. B., JIMENEZ, S. M. C., Machado, E. C. L., DUTRA, R. A. F., LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Revista Ciências e saúde coletiva*, Rio de Janeiro, vol.13 no.5, p. 1675-1683 , 2008.

71. SOMMER, D.; ENDERLEIN, D.; ANTAKLI, A.; SCHÖNENBRÜCHER, H.; SLAGHUIS, J.; REDMANN, T.; LIERZ, M. I. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, Stuttgart, v. 6, p.383-389, 2012.

72. SONCINI, R.A.; MORAES, M.A.Z.; COSTA, J.L.A. Transmissão horizontal de *Salmonella enteritidis* em pintos de um dia de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.2, p.94, 2000.

73. STERZO, E. V., VARZONE, J. R. M., FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Andradina, v.7, n.2, p. 129-138, 2008.

74. SUO, B.; HE, Y.; TU, S.; SHI, X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O 157 and *Listeria monocytogenes* in meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n.6, p. 619-629, 2010.

75. TASKILA, S., TUOMOLA, M., OJAMO, H. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. **Food Control**, v. 26, p. 369-377, 2012.

76. TESSARI, E.N.C., CARDOSO, A.L.S.P., CASTRO, A.G.M., ZANATTA, G.F., KANASHIRO, A.M.I. Incidência de *Salmonella* sp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivos do Instituto Biológico**., São Paulo, v.70, n.3, p.279-281, 2003.

77. UBA – União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2012**. 57p, 2012. Disponível em: http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php. Acesso em: 02/11/2012.

78. VICTÓRIA, C., SILVA, R. C., ROMÃO, F. G., LANGONI, H. Pesquisa dos genes lipA e aprX em amostras de *Corynebacterium bovis*, e seu crescimento sob refrigeração. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.18, n.3, p. 408-416. 2011.

79. VIEIRA, V. R., NASCIMENTO, V. P., BORSOI, A., SANTOS, L. R. Número mais provável (NMP) de *Salmonella* sp. em cecos de frangos de

corde e correlação com a população linfocitária bursal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n.1, p.49-53, 2007.

80. VON RÜCKERT, D. A. S., PINTO, P. S. A., SANTOS, B. M., MOREIRA, M. A. S., RODRIGUES, A. C. A. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.2, p.326-330, 2009.

81. ZANCAN, F. T.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* sp. investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.

82. WHITE, P. L., NAUGLE, A. L., JACKONS, C. R., FEDORKA-CRAY, P. J., ROSE, B. E., PRITCHARD, K. M., LEVINE, P., SAINI, P. K. SCHROEDER, C. M., DREYFUSS, M. S., TAN, R., HOLT, K. G., HARMAN, J., BUCHANAN, S. *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the U. S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 3, p. 582-591, 2007.

83. WHYTE, P.; MC GILL, K.; COLLINS, J.D.; GORMLEY, E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 89, p. 53-60, 2002.