

ANA CRISTINA DOS REIS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
*Salmonella* sp. EM OVOS DE GALINHAS CONTAMINADOS  
ARTIFICIALMENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

F383a  
2011

Ferreira, Ana Cristina dos Reis, 1973-  
Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella*  
sp. em ovos de galinhas contaminados artificialmente / Ana  
Cristina dos Reis Ferreira. – Viçosa, MG, 2011.  
xii, 41f. : il. ; 29cm.

Orientador: Bernadete Miranda dos Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 34-41.

1. Galinha - Ovos. 2. *Salmonella*. 3. Ácido desoxirribonucleico.  
4. Diagnóstico molecular. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 636.508842

ANA CRISTINA DOS REIS FERREIRA

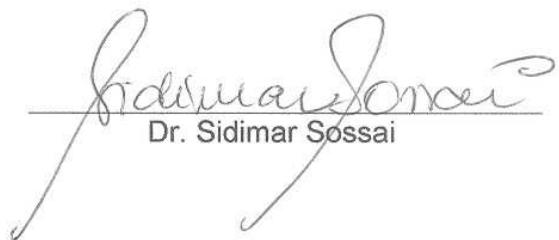
**AVALIAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
*Salmonella* sp. EM OVOS DE GALINHAS CONTAMINADOS  
ARTIFICIALMENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2011.



Profª Maria Aparecida S. Moreira  
(Coorientadora)



Dr. Sidimar Sossai



Profª Bernadete Miranda dos Santos  
(Orientadora)

*Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser.. mas, Graças a Deus, não somos o que éramos.*

Martin Luther King

*À Letícia Sandra Ferreira Birlan, minha  
amada filha, a verdadeira razão de minha  
presença aqui.*

*A meu pai, que tanto se orgulharia desse  
momento e de mim, mas não lhe foi  
possível esperar.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado.

À professora Bernadete Miranda dos Santos, pela orientação.

À minha mãe e à minha adorada filha, Letícia, pela paciência e compreensão em meus momentos de ausência.

Ao professor Patarroyo pela utilização do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores.

Aos técnicos dos laboratórios, Marcinho, Chico e Deusdete, pela disposição em ajudar.

Ao colega Sidimar, pelos conselhos, pelas ideias, pelas conversas e pela disponibilidade.

Aos meus queridos colegas, Sthefany, Janaína, Isabela, Leandro e Vitor, pela dedicação, paciência e, sobretudo, pela amizade e ajuda durante as extrações do DNA e PCR, possibilitando ótimos e agradáveis momentos de convivência.

A todos os amigos que fiz nesse tempo, principalmente Jackie, Jussara, Neali, Lidiane e Lívia. A elas agradeço o convívio sempre parceiro.

## **BIOGRAFIA**

ANA CRISTINA DOS REIS FERREIRA, filha de João Ferreira da Silva e Maria Célia dos Reis Ferreira, nasceu em 22 de maio de 1973 em Formiga no estado de Minas Gerais.

Em 24 de março de 2000, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade de Alfenas – UNIFENAS.

Em 5 de março de 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado, em Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concentrando seus estudos na área de veterinária preventiva e saúde pública, submetendo-se a defesa da dissertação em 23 de fevereiro de 2011.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELA .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Histórico .....	4
2.2. <i>Salmonella</i> sp. ....	5
2.3 Patogenicidade de <i>Salmonella</i> sp. ....	7
2.4. Gene <i>invA</i> .....	10
2.5. Salmoneloses aviárias .....	10
2.6. Contaminação do ovo por <i>Salmonella</i> sp. ....	13
2.7 Salmonela e saúde pública .....	17
2.8 Justificativas e objetivos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Bactérias .....	21
3.2 Contaminação dos ovos.....	21
3.3. Coleta das gemas .....	22
3.4. Extrações de DNA .....	22
3.5. PCR .....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5. CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34



## LISTA DE TABELA

	<b>Página</b>
1 Concentração e pureza das amostras de DNA extraído, de acordo com os dois protocolos que utilizaram as partículas de sílica.....	27

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Resultado da PCR, que utilizou o <i>kit</i> GenElute Bacterial Genomic DNA para a extração do DNA bacteriano .....	29
2 Resultado da PCR obtido da extração de DNA de <i>Salmonellas</i> sp. em gemas de ovos contaminados artificialmente .	30

## RESUMO

FERREIRA, Ana Cristina dos Reis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella* sp. em ovos de galinhas contaminados artificialmente.** Orientadora: Bernadete Miranda dos Santos. Coorientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Avaliou-se a eficiência de três protocolos para a extração de DNA genômico de bactérias do gênero *Salmonella* em ovos de galinhas livres de patógenos específicos – SPF. Foram utilizados 75 ovos, divididos em cinco grupos com 15 ovos cada. Três grupos de ovos foram inoculados com culturas de *Salmonella* sp. Um quarto grupo foi inoculado com cultura de *Escherichia coli*. O quinto grupo foi o controle negativo, que recebeu solução salina 0,85% estéril. Os ovos ficaram incubados na temperatura em torno de 20 – 25 °C durante 24 horas. Após esse intervalo foram colhidas cinco gemas de cada grupo, as quais foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos; o sobrenadante resultante foi descartado. Após o descarte, adicionou-se PBS pH 7,2 e centrifugou novamente-se novamente. O sedimento obtido de cada grupo foi utilizado na extração do DNA genômico bacteriano. Os métodos utilizados de extração foram: por partículas de sílica e um kit comercial – GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma®). O DNA extraído foi mantido em temperatura de – 20 °C até a avaliação por PCR. Os *primers* utilizados são relacionados com o gene *invA* e resultaram em uma amplificação de 284 pares

de base. Os produtos de amplificação foram visualizados em transluminador com luz ultravioleta. Os resultados demonstraram que o método de extração por partículas de sílica foi o mais eficiente, por obter um DNA de boa qualidade e quantidade suficiente para conseguir bons resultados na técnica de PCR.

## ABSTRACT

FERREIRA, Ana Cristina dos Reis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February, 2011. **Assessment of *Salmonella* sp. DNA extraction methods in artificially infected chicken eggs.** Adviser: Bernadete Miranda dos Santos. Co-advisers: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

The present study has assessed the efficiency of different protocols for the genomic DNA extraction of *Salmonella* in SPF (Specific Pathogen Free) hen eggs. Seventy-five eggs were divided into five groups of fifteen eggs. Three of these groups of eggs were inoculated with enteric *Salmonella* cultures. One of the five groups was inoculated with *Escherichia coli* bacterium culture. And the last group of eggs was the negative control group, which received saline solution 0.85% infertile. The eggs were incubated on a temperature that varied from 20 to 25 °C during 24 hours. Five yolks were collected from each group every 24 hours. These yolks were homogenized and centrifuged for 10 minutes. The supernatant was rejected. After that, PBS pH 7.2 was added and it was once again centrifuged. The sediment obtained from each group was used for the extraction of bacterial genomic DNA. The silica particle and commercial kit methods were used for extraction— GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma®). The extracted DNA was kept under the temperature of 20 °C until PCR assessment. The primers used were related with the *invA* gene and resulted in 284 base pair amplification products. Such amplification products

were visualized in UV transilluminator. Results showed that the silica particle extraction method was the most efficient one, since good quality and enough DNA was obtained to achieve good results with the PCR technique.

## 1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de ovos no Brasil caracteriza-se pela produção para consumo *in natura* e industrializados. A produção é feita predominantemente no sistema de criação em gaiolas, com granjas de cria e recria separadas das granjas de produção (UBA, 2009).

A produção de ovos comerciais é concentrada na região Sudeste do País, onde se observaram 55% da produção de ovos brancos e 40% da produção de ovos vermelhos. Em relação ao consumo por habitante do produto, os níveis se mantiveram praticamente os mesmos entre 2008 e 2009, com média de 120 unidades *per capita*/ano. Em 2009 foram exportadas 36.887 toneladas de ovos e produtos de ovos (UBA, 2009).

O ovo é um importante produto de origem avícola e, por ser rico em nutrientes e de alta digestibilidade, exige alguns cuidados para que não se transforme em fonte de intoxicação alimentar e para que chegue ao consumidor com bom padrão de qualidade. Por ser um produto perecível, deveria ser mantido sob refrigeração desde a produção até o consumo. Entretanto, esse procedimento resulta em aumento do custo de produção e, conseqüentemente, aumento do custo para os consumidores (FIGUEIREDO, 2008).

Pela Portaria nº 1, de fevereiro de 1990, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ovo fresco é aquele em casca que não foi conservado por qualquer processo industrial; ele perderá a sua denominação

de fresco se for submetido intencionalmente a temperaturas inferiores a 8 °C. A temperatura recomendada para armazenamento do ovo fresco está entre 8 °C e 15 °C, com umidade relativa do ar entre 70 e 90%. Se o ovo for conservado em uma temperatura inferior a 8 °C, passa a receber a denominação de ovo frigorificado.

No mercado interno, por não haver uma obrigatoriedade de refrigeração, os ovos são acondicionados, desde o momento da postura até a distribuição final, em temperaturas ambientes, sendo, em alguns casos, refrigerados apenas nas casas dos consumidores.

São cada vez mais crescentes as preocupações referentes à qualidade dos alimentos em toda a cadeia produtiva; paralelamente, aumenta a capacidade crítica dos consumidores, tornando-os mais seletivos com relação às suas escolhas, inclusive de alimentos (PINTO *et al.*, 2004).

Análises epidemiológicas têm sugerido que o consumo de ovos ou produtos contendo ovos crus contaminados é a maior fonte de infecção em surtos de toxinfecção alimentar em que o agente etiológico é a *Salmonella* sp. (GUAN *et al.*, 2006).

Surtos de salmonelose em humanos causado por salmonelas aratíficas têm aumentado drasticamente no mundo inteiro desde a década 1980 e tornaram-se um problema importante para a indústria avícola e a saúde pública. A salmonelose é uma zoonose endêmica, que possui alta morbidade, sendo de difícil controle e erradicação (SILVA; DUARTE, 2002). As salmonelas também são responsáveis por consideráveis prejuízos econômicos para a indústria avícola, devido à sua importância em patologia aviária (ÁVILA, 2007).

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia da produção de aves envolve a transmissão vertical, via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados. Envolve, também, a transmissão horizontal, com a contaminação do ambiente e da ração, além da existência de diferentes espécies animais, que constituem reservatórios da bactéria. A doença nas aves pode não causar sinais clínicos ou lesão, tornando a ave portadora assintomática, o que dificulta o controle nas granjas, exigindo monitoramento constante do plantel (BERCHIERI JUNIOR, 2000).

O diagnóstico bacteriológico com isolamento e identificação da bactéria em ovos e outros produtos é a técnica oficial recomendada pelo Ministério da



Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA), porém é um teste trabalhoso e demorado. A pesquisa microbiológica envolve etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivo, testes bioquímicos e sorológicos. A obtenção de um resultado negativo para algum microrganismo suspeito requer cerca de quatro dias, e a confirmação de resultado positivo, até 15 dias. A metodologia convencional de diagnóstico apresenta outras limitações, uma vez que requer um número de células viáveis suficiente para permitir o seu isolamento. Além disso, variações na morfologia e no perfil bioquímico das colônias, nos diferentes meios descritos na literatura, são fatores que aumentam a margem de erro do diagnóstico microbiológico (CAMPOS, 2005).

A utilização de técnicas de conservação de alimentos, como, manutenção em baixas ou altas temperaturas, entre outras, pode permitir o surgimento de células viáveis não cultiváveis, que, quando da realização do teste microbiológico, não apresentam condições favoráveis a um crescimento que permita a sua identificação. Entretanto, ao permanecer em condições favoráveis à sua proliferação, pode atingir doses infectantes (FLORESTA, 2006).

Várias pesquisas têm sido realizadas visando introduzir metodologias rápidas e sensíveis para enfrentar a agilidade que o mercado exige. Entre essas novas metodologias está a reação em cadeia da polimerase (PCR), que representa um grande avanço em termos de velocidade, sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos e tem sido cada vez mais utilizada para identificar várias espécies bacterianas a partir de alimentos e amostras clínicas. No entanto, para obtenção de bons resultados da técnica de PCR, são necessários protocolos de extração de DNA práticos, rápidos e de baixo custo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico

No final do século XIX, foram identificadas as primeiras bactérias do gênero *Salmonella*. *Bacterium typhosa* foi a primeira a ser reconhecida como patógeno, por Eberth, em 1880, isolada de baço e linfonodo de seres humanos. A descrição morfológica dessa bactéria foi feita em 1884 por Gaffky (BARROW, 1993). Em 1885, Salmon e Smith isolaram um bacilo de suínos doentes, ao qual denominaram *Bacterium suispestifer*, considerando-o erroneamente o agente da peste suína. Essa bactéria foi denominada posteriormente *Salmonella choleraesuis*. Gartner, em 1888, isolou uma bactéria de um jovem morto de gastroenterite, que havia comido carne de uma vaca doente; mais tarde, esta bactéria foi denominada *Bacillus enteritidis* (MERCHANT; PACKER, 1980). Em 1895, Moore registrou o primeiro caso de salmonelose paratífica em ave doméstica. Em 1896, Achard e Bensaude isolaram *Bacterium paratyphi B* de enfermidades humanas (CORREIA; CORREIA, 1992). Neste mesmo ano na Bélgica, ocorreram casos de gastroenterite em seres humanos, pela ingestão de salsicha contaminada por *Bacterium enteritidis* e *Bacterium typhimurium* (BARROW, 1993). Em 1899, Rettger descreveu *Bacterium pullorum* como sendo a causa de uma septicemia fatal de aves jovens (SNOEYENBOS, 1984).

O nome genérico *Salmonella* foi proposto por Lignières em 1900, em homenagem a D. E. Salmon (MERCHANT; PACKER, 1980). No início do

século XX, a caracterização das bactérias do gênero *Salmonella* ainda era confusa. A partir de 1925, começou a ficar mais clara devido à utilização de provas sorológicas, sendo incluídos no gênero *S. Typhimurium* e *S. paratyphi*. Posteriormente, foram descritos vários sorotipos de *Salmonella* sp., pela terminologia de White (1929), atingindo aproximadamente 900 sorotipos, que deram origem ao esquema de Kaufmann-White, o qual foi reconhecido a partir de 1932 (CORREIA; CORREIA, 1992).

## **2.2. *Salmonella* sp.**

A *Salmonella* sp. pertence à família Enterobacteriaceae, que consiste em um importante grupo de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal; é classificada como um bastonete Gram-negativo, aeróbica e anaeróbica facultativa, não esporulada, tribo Salmonelleae, estando estritamente relacionada com *Escherichia coli*. Podem ser diferenciadas de outras enterobactérias e dentro do mesmo gênero com base em reações bioquímicas, meios diferenciais e sorologia. Apresenta motilidade através de flagelo peritríquico, porém com algumas espécies não móveis, como *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* (SANTOS, 2005).

O pH de crescimento varia entre 4 e 9, e a faixa de temperatura de crescimento está entre 7 °C e 47 °C, com ótimo entre 35 °C e 37 °C. A atividade de água mínima para o crescimento é de 0,94. As bactérias produzem gás a partir da fermentação da glicose e ácido sulfídrico. Elas são capazes de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitratos a nitritos e utilizar o citrato como fonte de carbono (NASCIMENTO; SANTOS, 2006). Em placas de Petri contendo meio nutritivo, costumam apresentar colônias com cerca de 2 a 4 mm de diâmetro.

Uma grande variedade de desinfetantes químicos é eficaz em controlar a *Salmonella* sp. peróxido de hidrogênio, ácido acético, ácido lático e cloro reduzem o nível de bactéria em carcaças de frango; e formaldeído, peróxido de hidrogênio e poli-hexametileno biguamida controlam nas incubadoras. Produtos à base de fenóis, amônia quaternária, glutaraldeído, iodo e formol são indicados para a desinfecção de instalações contaminadas (GAST, 1997).

A classificação do gênero *Salmonella* obedece ao esquema Kauffmann-White, que o divide em duas espécies: *S. entérica* e *S. bongori*. *S. enterica* apresenta seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; já *Salmonella bongori* apresenta uma única subespécie: *bongori* (POPOFF, 2003). Alguns autores, com base em características fenotípicas dividem o gênero em três espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea* (PREBAF, 2008).

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de sorovares, com base na caracterização de seus antígenos capsulares (Vi), somáticos (O) e flagelares (H).

- **Antígeno O ou antígeno somático:** LPS (lipopolissacarídeo) presente na parede celular de todas as espécies de *Salmonella*, lembrando que é o antígeno imunodominante da grande maioria das bactérias Gram-negativas (URUEÑA, 2003). Esses antígenos possuem natureza glicolipídica, identificando-se com a endotoxina. É termoestável (100 °C ou 120 °C/2h) essencial virulência, já que confere resistência do microrganismo no hospedeiro humano (IANKOV, 2004). De acordo com estudos desses autores, quando LPS é isolado e purificado, é responsável por uma série de reações características de infecções por bactérias Gram-negativas em animais e humanos voluntários, como febre, dor de cabeça, náusea, diarreia, alterações na contagem de leucócitos e trombócitos, podendo levar à morte.

Outra variação desse antígeno resulta na mudança da aparência colonial da cepa na forma lisa e na forma rugosa. Essa mudança é acompanhada pela perda de antígenos O e, algumas vezes, pela virulência.

- **Antígeno H ou antígeno flagelar:** de natureza proteica, a composição e ordem dos aminoácidos da proteína flagelina (uma subunidade do filamento helicoidal que forma o flagelo) determinam a especificidade flagelar (fatores antigênicos do grupo H); é termolábil (não resiste à temperatura de 100 °C/1h) e ocorre em poucos sorotipos (CVE/SP, 2001).

- **Antígeno Vi ou antígeno de virulência:** formado por um complexo glicidoproteico. Ocorre em apenas três sorotipos. É termolábil, sendo destruído

pelo calor de 60 °C durante uma hora e por ácidos e fenol (SANTOS, 2005). *S. typhi* possui o antígeno Vi, importante para sua caracterização. Também pode ser encontrado em *S. Paratyphi* e algumas cepas de *S. Dublin*. Assim, o antígeno “O” também confere resistência ao microrganismo no hospedeiro humano, em especial à fagocitose (IANKOV, 2004).

As salmonelas podem crescer em produtos refrigerados em temperatura de 2 °C; algumas permanecem viáveis em produtos congelados, por longos períodos. Podem sobreviver em alimentos desidratados e com baixa atividade de água, mas não competem bem com outros microrganismos presentes em alimentos, como bactérias putrefativas, bactérias lácticas e outras (EKPERIGIN; NAGAJARA, 1998)

### **2.3 Patogenicidade de *Salmonella* sp.**

A patogenicidade da salmonela em aves está dividida em três fases:

- **Fase 1:** consiste na colonização do intestino. A colonização da porção distal do intestino delgado e do colon é o passo inicial e necessário na patogenia da salmonelose entérica. Bactérias fusiformes nativas que ocupam a mucosa do epitélio intestinal geralmente inibem o crescimento das salmonelas por meio da produção de ácidos orgânicos voláteis. A flora normal também bloqueia o acesso aos sítios de ligação necessários pelas salmonelas. Alguns fatores rompem a flora normal, como terapia com antimicrobianos, dietas e privação de água, que aumenta a suscetibilidade do hospedeiro a salmonelose entérica e septicêmica. As fímbrias têm importância na ligação e colonização das bactérias durante a fase inicial da patogênese da enterite, o que tem sido demonstrado em camundongos. A fímbria adere melhor à mucosa do íleo do que as cepas isogênicas (sem fímbrias), sendo mais infectante. O peristaltismo reduzido também predispõe à colonização por salmonela, porque permite um supercrescimento temporário de salmonelas no intestino delgado. O peristaltismo é estimulado por uma microflora ativa nativa, e a supressão destas aumenta a suscetibilidade à colonização (GOMES, 2008).

- **Fase 2:** é a invasão do epitélio intestinal que envolve as extremidades superiores das vilosidades do íleo e cólon. A *Salmonella* sp. penetra na célula intestinal sem aparentemente causar a sua morte, uma vez que não há

mudanças morfológicas até mais tarde no processo normal da enfermidade. Os organismos podem multiplicar e infectar as células adjacentes ou passar até a lâmina própria, ou delas continuar a se multiplicar. Elas são fagocitadas e sequestradas nos linfonodos regionais. Após a invasão, as extremidades das vilosidades contraem e são invadidas por neutrófilos (GOMES, 2008).

- **Fase 3:** é o estímulo à exsorção de fluidos. A resposta inflamatória na mucosa intestinal é importante fator no extravasamento de fluido intestinal. Prostaglandinas são liberadas como resultado a essa resposta ativa a adenilatociclase que resulta na grande secreção de água, bicarbonatos e cloretos no lúmen intestinal. A resposta inflamatória também dispara a liberação de substâncias vasoativas, que, por sua vez, aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal, levando-os à exsorção de fluido. Essa exsorção é acompanhado por grande invasão de neutrófilos das vilosidades com ileíte aguda e colite. Os neutrófilos são também eliminados pelas fezes, e a sua presença possui valor diagnóstico (GOMES, 2008).

A patogenia da septicemia pelas salmonelas está intimamente relacionada ao efeito da endotoxina liberada da parede da célula bacteriana. A atividade endotóxica está associada com o componente do lipídio A do LPS da parede celular. Muitos sinais da septicemia por salmonelas são similares àqueles produzidos pela inoculação experimental de endotoxinas purificadas. Esses efeitos incluem: febre, hemorragias associadas ao consumo dos fatores de coagulação, leucopenia seguida de leucocitose, depleção do glicogênio hepático com hipoglicemia, hipotensão e choque, que são frequentemente fatais (MARCUS et al., 2000)

A virulência das salmonelas é multifatorial e complexa, incluindo presença de fímbrias, de flagelos, mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de enterotoxinas, citotoxinas e endotoxinas (RODRIGUES, 2005).

A *Salmonella* sp. é um patógeno intracelular facultativo e possui grande número de genes que são determinantes na doença. Esses genes são encontrados em plasmídios ou dentro de cromossomos como unidades únicas, em conjunto de poucos genes, pequenas ilhas ou extensos cassetes genéticos compostos por uma série de genes e *operons* (Ilha de Patogenicidade - IPs) (MARCUS et al., 2000).

As IPs são definidas como extensos cassetes genéticos dentro de cromossomos que codificam substâncias responsáveis pelo estabelecimento de interações específicas com o hospedeiro e são também necessárias para a virulência bacteriana em um dado modelo animal (MARCUS et al., 2000).

As IPs constituem-se de um grupo de genes envolvidos na codificação de fatores específicos de virulência. Até o presente momento, 10 IPs foram descritas (BHUNIA, 2008). O fenótipo invasivo é determinado por um grande *set* de genes localizados nas IPs, os quais estão presentes em todas as cepas invasivas. A IP-1 é encontrada em *Salmonella bongori* e em todas as sorovares da *Salmonella entérica*, e os *operons Inv(invasibility)* e *Hil (hiperinvasibility)* estão presentes nessa ilha, em meio a outros genes e proteínas (MARCUS et al., 2000). A IP-1 e IP-2 são as duas melhores quanto ao sistema invasivo, tendo sido reportado que ambos os sistemas, apesar de muito semelhantes, aparentemente exercem funções diferentes, de forma que a interação inicial com as células epiteliais intestinais do hospedeiro e a *Salmonella* sp. ocorre via SPI-1 (no lúmen intestinal), através do contato entre hospedeiro-patógeno, seguido da injeção de proteínas responsáveis pela virulência dentro das células hospedeiras, habilitando a entrada do patógeno no epitélio intestinal; finalmente, a infecção sistêmica fica a cargo do sistema SPI-2, somente após o acesso do patógeno à célula hospedeira (GÁLAN, 2001).

A expressão do gene de SPI-1 ocorre na luz intestinal, sendo regulada pelo contato da bactéria com a célula e por diferentes fatores ambientais, como concentração de oxigênio, osmolaridade e pH. Outro papel de SPI-1 está associado à expressão de proteínas responsáveis pelo processo inflamatório no epitélio intestinal e pelos sintomas de diarreia. A replicação intracelular de *S. enterica* está associada à expressão dos genes contidos na SPI-2, que são ativados quando a bactéria é internalizada (HENSEL, 2004).

Outro importante influenciador da invasibilidade das salmonelas é o sistema de secreção tipo III - SSTT, que é codificado por alguns genes, inclusive o *invA*. Esses sistemas são responsáveis pela secreção de proteínas bacterianas, que promovem a entrada da bactéria no interior das células-alvo. O SSTT é um mecanismo de virulência compartilhado por várias bactérias Gram-negativas. Sua função é levar proteínas das bactérias para o citoplasma da célula hospedeira, onde elas sequestram processos sinalizadores e

reorganizam a actina, facilitando o processo de endocitose da bactéria (GÁLAN, 2001).

## 2.4 Gene *invA*

O gene *inv* está localizado na SPI-1, sendo o primeiro no *operon*, onde os genes *invA*, B e C estão arrançados na mesma unidade transcricional e o gene *invD* está localizado em uma unidade transcricional diferente. A função do gene *invA* é aumentar a capacidade de invasão da *Salmonella* sp. nas células epiteliais, bem como transportar proteínas específicas através da membrana celular bacteriana (GÁLAN *et al.*, 1992).

Acredita-se que o gene *invA* seja o responsável por inicializar o processo de internalização de *S. typhimurium* (ST) em cultura de células epiteliais. Mutações dentro desse *operon* (*inv*) deixaram a salmonela incapaz de invadir as células MDCK *in vitro* (GÁLAN, 1998).

O gene *invA* foi detectado em 630 amostras de salmonelas pertencentes a 100 sorovares diferentes (RAHN *et al.*, 1992) e parece ser conservado em todos os sorotipos de salmonela, sendo considerado o gene-alvo para a detecção dessa bactéria pela técnica da PCR.

## 2.5. Salmoneloses aviárias

O termo salmonelose aviária inclui infecções clínicas ou subclínicas em aves por vários sorotipos de bactérias do gênero *Salmonella*, podendo atingir todas as fases da ave; ela é causa comum de epidemias, constituindo um fator prioritário de controle (SANTOS, 2005).

Segundo Back *et al.* (2006), as salmonelas podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas manifestações clínicas:

- **Grupo 1:** *Salmonella gallinarum* – *pullorum*, que causa o tifo aviário e a pulorose. Esse sorotipo é altamente adaptado às aves, as quais se diferenciam uma das outras por ficarem imóveis; é transmitido verticalmente e causa doença sistêmica com mortalidade (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).



- **Grupo 2:** este grupo inclui as salmonelas denominadas paratíficas, que compreendem um número relativamente grande de sorotipos. São todas móveis e podem infectar aves e outros animais. A infecção em aves é comum por muitos sorotipos deste grupo, porém estes não causam doença sistêmica nem mortalidade. Com raras exceções, pode ocorrer alguma manifestação clínica em aves muito jovens. Por outro lado, este é o grupo que tem causado maior preocupação de saúde pública, pois aves e ovos contaminados podem ser fonte de salmonela para o homem.

- **Grupo 3:** é formado por duas salmonelas paratíficas de maior importância: *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. O motivo dessa distinção é a maior patogenicidade que elas apresentam quando comparadas com o restante das salmonelas paratíficas. Estes dois sorotipos são os líderes de toxi-infecção alimentar no homem, podendo ocasionalmente ser considerados patogênicos para as aves, principalmente jovens.

- **Grupo 4:** é formado pela *Salmonella arizonae*. A infecção tem importância econômica principalmente para a indústria de perus.

A principal rota de infecção das salmonelas paratíficas é a via oral, porém a infecção por aerossol também tem sido demonstrada. Uma vez ingerida, a bactéria pode localizar-se no papo e no intestino e é eliminada de forma intermitente pelas fezes, sem qualquer manifestação clínica da doença. A contaminação fecal da casca de ovos na granja pode ser fonte de disseminação de salmonela para o incubatório (SESTI, 2001; BACK, 2002).

Eventualmente, pode ocorrer uma infecção sistêmica e colonizar outros órgãos, como o aparelho reprodutor, havendo a transmissão vertical, ou seja, transmissão transovariana.

A capacidade de transmissão vertical, a grande suscetibilidade dos pintos ao nascimento, pois necessitam de uma dose infectiva menor para que se estabeleça uma infecção, e a extensa capacidade de difusão da salmonela entre pintos dentro do mesmo nascedouro fazem com que a contaminação dos progenitores tenha papel fundamental e preponderante na difusão da enfermidade nas granjas avícolas. A ausência de *Salmonella Enteritidis* nos plantéis de melhoramento genético, nos lotes de avós e nos lotes de matrizes é de importância vital em qualquer tentativa de obter um produto final livre de *S. paratíficas* (ÁVILA, 2007).

Após a eclosão, pintos infectados que conseguem nascer disseminam a doença a outros pintos normais no nascedouro, nas caixas e nos galpões de criação (SILVA, 2003). Todas as fontes potenciais de contaminação são importantes, mas o ovo fértil é crítico na cadeia de produção (LEITÃO, 2001).

Humphrey *et al.* (1991) relataram que aves matrizes de corte e poedeiras de ovos de mesa, naturalmente infectadas por SE, não mostraram sintomatologia clínica, aumento da taxa de mortalidade ou queda na produção de ovos, embora Lister (1988) tenha observado algumas alterações no aspecto clínico de algumas aves de um lote infectado. As lesões *post-mortem* encontradas em poedeiras infectadas constituem-se de ovários deformados, diminuídos, pálidos ou congestos. Os óvulos encontram-se diminuídos ou flácidos, com folículos mal formados, de aspecto cístico e ovos com casca mole ou alojados na cavidade abdominal, produzindo peritonite; o oviduto pode apresentar-se atrofiado (COOPER *et al.*, 1989).

Miyamoto *et al.* (1998) verificaram a presença de SE no útero de aves que foram infectadas experimentalmente, por meio da região mais baixa e mais alta da vagina, demonstrando a progressão ascendente pelo aparelho reprodutor, culminando com a contaminação dos ovos.

Segundo Barrow e Lovell (1991), a maioria dos ovos infectados, produzidos por aves infectadas por *S. enteritidis* (SE), estão contaminados em sua superfície e não são o resultado de uma infecção ovárica.

Golden (2008) mostrou que galinhas que passam por muda forçada aumentam a proporção de ovos contaminados por SE nas primeiras cinco semanas pós-muda e que a doença se manifesta de forma clínica. A muda forçada altera o estado imune das aves, pois modifica o estado fisiológico, tornando-se um manejo e estressante para as aves.

A patogenicidade de salmonelas paratíficas para poedeiras comerciais é complexa e depende de fatores associados à bactéria, à ave e às condições de criação. Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória, podendo desencadear septicemia (GAST, 1997; BARROW, 1999).

## 2.6. Contaminação do ovo por *Salmonella* sp.

O conteúdo interno dos ovos, geralmente, está livre de microrganismos. A contaminação acontece, primordialmente, após a postura pelo contato do ovo com o meio ambiente, como fezes na cama, material do ninho, mãos do tratador, água, bandejas, piso ou qualquer local contaminado, inclusive incubatórios, com posterior penetração da bactéria através da casca e/ou trincas, caracterizando a transmissão horizontal (ANDRADE *et al.*, 2008).

Os ovos também podem se contaminar como resultado da colonização do sistema reprodutor da galinha durante a constituição do folículo ovariano e, ou, formação do albúmen no oviduto, antes da formação da casca, resultando em transmissão vertical. Os ovos podem contaminar-se após a formação da casca, durante a passagem pela cloaca (ANDRADE *et al.*, 2008).

Howard *et al.* (2005) verificaram a capacidade de a bactéria invadir os folículos ovarianos em diferentes estágios de maturidade. Os resultados sugerem que folículos extremamente imaturos são mais suscetíveis à invasão de ST e SE do que nas outras fases de desenvolvimento folicular.

Gantois *et al.* (2009) acreditam que o sorovar *Enteritidis* possui características intrínsecas que permitem uma associação epidemiológica com ovos de galinhas que ainda estão indefinidos. Há indícios de que ataques por este sorovar sobrevivem com a ajuda de moléculas antimicrobianas durante a formação do ovo no oviduto da galinha e no interior do ovo, parecendo exigir uma combinação única de genes, que codificam para uma melhor proteção da parede celular e reparação de dano celular e molecular, entre outros.

O sistema reprodutivo das galinhas é composto pelo ovário, e este pode ser dividido em cinco regiões funcionais: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina. O infundíbulo capta os folículos da ovulação; o magno produz o albúmen; o istmo é o depósito das membranas da casca; o útero forma a casca; e a vagina está envolvida na ovoposição. Muito pouco se sabe, entretanto, sobre o exato sítio nos tecidos reprodutivos, onde residem as bactérias e os fatores bacterianos e de acolhimento, que desempenham um papel na associação entre o aparelho reprodutivo e a bactéria. A *Salmonella* sp. que coloniza a tuba uterina pode ser incorporada no albúmen, nas

membranas da casca ou na casca do ovo em si, dependendo do local de colonização (GANTOIS *et al.*, 2009).

Em vários estudos, demonstrou-se que a SE foi isolada do tecido reprodutivo das aves infectadas, na ausência de colonização intestinal pela bactéria. Além disso, este sorovar é capaz de persistir nos tecidos reprodutivos de galinhas infectadas tanto natural como experimentalmente, mesmo as aves gerando uma resposta imune inata e adaptativa à infecção, indicando que as bactérias podem permanecer no meio intracelular e escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A deposição de *Salmonella* sp. em ovos é, portanto, uma consequência da colonização dos tecidos reprodutivos de galinhas poedeiras infectadas (GUAN *et al.*, 2006) .

A estrutura do ovo pode ser descrita em relação à penetração dos microrganismos, da seguinte forma:

A) Casca: os poros da casca dos ovos, que permitem a difusão gasosa, são a causa da perda de água e a porta de entrada dos microrganismos. Os ovos recém-postos também podem adquirir alguns microrganismos através do oviduto (VALE *et al.*, 2000). A penetração de bactérias é limitada pela casca, que se constitui em barreira física, pelas membranas da casca, que servem como filtros e retêm os microrganismos, e pelo albúmen, que possui mecanismos químicos e físicos que impedem a multiplicação e o descolamento bacteriano. Ovos com má qualidade de casca e ovos de galinhas velhas apresentam porosidade, a qual permite maior passagem de bactérias e esporos de fungos. O esfriamento do ovo após a postura causa progressivo encolhimento da sua parte interna, com início de formação da câmara de ar, arrastando bactérias para o seu interior através dos poros da casca.

B) Cutícula: é formada por uma camada delgada de glicoproteínas, que reveste a casca e protege 99% dos poros em curto período. A cutícula é uma cobertura importante que atua como barreira microbiana, fechando os poros e resultando na redução de permeabilidade da casca. A proteção da casca pela cutícula tem a duração de aproximadamente quatro dias; ao final desse tempo o efeito protetor diminui, provavelmente pela formação de gretas, causadas pela dessecação.

C) Membranas da casca: o albúmen está circundado e é contido por um duplo envelope fibroso, as membranas da casca, que são mantidas aderidas, exceto na região da câmara de ar, onde se separam para formar essa camada. A membrana interna da casca (MIC) possui duas camadas distintas de fibras e deposita-se acima do albúmen, enquanto a membrana externa da casca (MEC), com três camadas de fibras, encontra-se ligada à casca verdadeira. A MIC é mais porosa que a MEC; sua reputação de ser uma barreira mais efetiva à penetração bacteriana deve-se ao fato de possuir poros de menor diâmetro (NASCIMENTO; SALLE, 2003).

Em relação a penetração bacteriana, as membranas agem como um filtro, sendo a MIC mais impenetrável às bactérias que a própria casca. No entanto, a resistência das membranas pode ser quebrada quando uma alta contaminação ocorre e, especialmente, quando os ovos são mantidos a 37 °C (NASCIMENTO; SALLE, 2003).

O ovo mantém ainda barreiras intrínsecas de defesa contra a multiplicação bacteriana. Entre elas está a presença de certas proteínas, como a lisozima, avidina, ovoflavoproteína e ovotransferrina, presentes no albúmen. Além disso, o albúmen apresenta um conteúdo naturalmente baixo de ferro e seu pH é em torno de 9,0 fazendo com que não represente um ambiente favorável para a maioria dos microrganismos. Esses fatores intrínsecos inibem o crescimento bacteriano, quando a transmissão ocorre por via horizontal. Essa pode ser a explicação para a baixa frequência de contaminação e o pequeno número de microrganismos encontrados em ovos. Pesquisas realizadas com ovos comerciais indicam que, geralmente, menos de 1% deles estão contaminados por *S. enterica* e que, quando contaminados, o número de bactérias é em torno de 10 por ovos. Contudo, uma vez contaminados e expostos a temperaturas favoráveis à sua multiplicação, os ovos podem apresentar grande número de bactérias por ocasião do consumo (TÉO; OLIVEIRA, 2005).

Barros et al. (2001) imergiram ovos em cultura de *S. enteritidis* e não detectaram a presença dessa bactéria no interior dos ovos, ou seja, no albúmen e na gema. Esses autores atribuíram essa ausência a fatores antimicrobianos encontrados no albúmen, como a ação de enzimas e a deficiência do íon ferro.

A gema é um sítio potencial para a contaminação de ovos por *salmonella*; devido ao seu conteúdo em nutrientes, mesmo quando o sítio inicial de deposição da bactéria é externo à gema, o crescimento pode se iniciar rapidamente. A gema apresenta um ambiente mais favorável à bactéria do que à clara, devido ao pH, em torno de 6,0, e ao conteúdo de lipídeos (JAY, 2000). As mudanças físicas e químicas na viscosidade da clara e na permeabilidade da membrana vitelina, ocorridas pelo envelhecimento do ovo, permitem migrações da bactéria até a gema.

Alguns dados têm demonstrado que galinhas infectadas por *Salmonella* Enteritidis botam uma porcentagem pequena (1 em 10.000 ovos) de ovos contaminados via gema. A maior parte da contaminação por SE se dá pela passagem do ovo pela cloaca ou após a postura, com o contato dos ovos com material contaminado (SILVA, 2003).

O crescimento de bactérias em ovos, após a postura, depende da temperatura de armazenamento; eles devem ser armazenados a 7 °C. A baixa temperatura no interior do ovo diminui a possibilidade de penetração da bactéria na gema, onde esta poderia se multiplicar mais rapidamente (BARROS et al., 2001).

A temperatura de estocagem é fundamental na preservação da qualidade microbiológica dos ovos. Bradshaw *et al.* (1990) inocularam *S. enteritidis* em ovos estocados a 37 °C, 15,5 °C e 7 °C e observaram maior multiplicação dessa bactéria nos ovos armazenados a 37 °C do que em 15,5 °C. Durante 94 dias de experimento, não foi observada multiplicação dessa bactéria em ovos armazenados a 7 °C. Segundo Miyamoto *et al.* (1998), quanto mais rápido os ovos forem armazenados sob refrigeração, menor será a capacidade de penetração de *S. enteritidis* e *S. typhimurium* através das cascas.

Portanto, o número de células de *Salmonella* no ovo, sua localização e o tempo de permanência do alimento em temperaturas favoráveis à multiplicação determinam diretamente os riscos a que serão expostos os consumidores.

## 2.7. Salmonela e saúde pública

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentes em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUNKLEY *et al.*, 2009). Devido a esse fato, há necessidade de controle da presença desse agente em alimentos, principalmente os de origem animal (DICKEL *et al.*, 2005).

Para que se possa evitar a ingestão de ovos contaminados, a detecção da presença de *Salmonella* sp. nesse alimento antes da chegada ao consumidor é de extrema importância. No Brasil, existe uma legislação referente à qualidade microbiológica dos alimentos, segundo a qual esse agente deve estar ausente nos diferentes tipos de alimentos testados (BRASIL, 2002).

Os riscos da infecção humana estão associados ao comércio de ovos com casca defeituosa, fina, porosa ou rachada, ou sujos com matéria orgânica, à falha ou inexistência de refrigeração ao longo da produção e comércio e ao equivocado manuseio do produto, ainda nos locais de produção e classificação (PINTO; SILVA, 2009).

Processos de produção de ovos livres de salmonelas, higienização após postura e refrigeração são pontos críticos de controle para redução dos surtos de salmonelose humana de origem alimentar (OLIVEIRA; SILVA, 2000).

No Brasil, as salmonelas paratíficas estão entre os principais agentes de doenças transmitidas por alimentos, tendo respondido por 21% do total de casos relatados e 76% dos surtos provocados por bactérias, no período de 1995 a 1999 (CVE/SP, 2001). Nos Estados Unidos, respondem por 54,5% dos surtos e 46,4% das mortes provocadas por bactérias, no período de 1993 a 1997 (OLSEN *et al.*, 2000).

A intoxicação alimentar por *Salmonella* sp. causa grandes prejuízos econômicos, devido ao emprego de recursos tanto públicos quanto privados. Há dispêndio com serviços médicos, queda da produtividade de pessoas doentes, perdas da indústria pelos alimentos rejeitados, funcionários doentes, entre outros. Portanto, a contaminação de alimento representa um elevado risco à saúde pública, principalmente para crianças, idosos e imunodeprimidos

(CORTEZ, 2007). A dose infectante é variável de acordo com a idade e saúde do indivíduo, como o alimento envolvido, e, ainda, com a linhagem da *Salmonella*, variando de 20 a 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/ por grama de alimento (FORSYTHE, 2002). Deve-se salientar que em alimentos com elevado teor de lipídios, como os ovos, as salmonelas ficam “protegidas” dentro dos glóbulos de gordura, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, fato que acaba por reduzir a dose infectante (LANDGRAF, 1996; FORSYTHE, 2002; FRANCO). Os alimentos envolvidos geralmente são aqueles com alto teor de umidade e com alta porcentagem de proteína, principalmente ovos e produtos à base de ovos (maionese, gemadas, glacê, etc.), carnes de ave, suínos e bovinos e derivados, leite e produtos lácteos (GERMANO; GERMANO, 2003).

A ocorrência de surtos de intoxicação alimentar por salmonelas em diversos países chamou a atenção para as fontes comuns de infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou de alimentos contendo ovos como responsável pela maioria dos surtos (FLORES, 2001).

O ovo, o alimento mais associado aos surtos por *Salmonella*, é um dos poucos alimentos consumidos em todo o mundo e tem sido importante na alimentação humana desde os primórdios da história (TERRA, 2001).

O consumo de ovos, entretanto, frequentemente diminuiu em função da associação do alimento com a bactéria. No Brasil, entretanto, devido à não notificação da doença, os dados, na maior parte das vezes, restringem-se à descrição de alguns casos isolados.

A partir de 1980, ocorreram surtos humanos causados pelo sorovar Enteritidis nos Estados Unidos e Europa, chamando a atenção pelas fontes comuns de infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsável pela maioria dos surtos (SILVA; DUARTE, 2002).

PERESI *et al.* (1998), investigando os surtos de salmonelose no Estado de São Paulo, concluíram que 95,7% deles foram causados por alimentos que continham em sua formulação ovos; em 87% os alimentos continham ovos crus.



Em pesquisa realizada com ovos coletados no comércio varejista de Campinas-SP, no período de janeiro a março de 1995, Oliveira e Silva (2000) observaram a presença de *S. enteritidis* em 9,6% das cascas e 3,2% das gemas dos ovos analisados.

Baú *et al.* (2001), analisando amostras de ovos produzidos em granjas e em pequenas propriedades da cidade de Pelotas, não encontraram nenhuma amostra positiva para salmonela nas cascas e nos conteúdos desses ovos. Resultado semelhante foi observado por Silva *et al.* (2004), em conteúdos de ovos comercializados em Maceió.

Cardoso *et al.* (2002), estudando o mercado de ovos da região de Descalvado-SP, não encontraram o microrganismo. Andreatti Filho *et al.* (2001) e Tavechio *et al.* (2002) identificaram *S. enteritidis* como o principal sorovar isolado de materiais avícolas e fontes não humanas, respectivamente, no Estado de São Paulo.

Andrade *et al.* (2004), analisando ovos comercializados em supermercados, feiras livres, postos de venda e granjas de Goiana-GO, observaram a presença de vários microrganismos – entre os quais a *Salmonella* sp. – em 4,46% de ovos analisados.

A *S. enteritidis* é responsável por 24,7% dos relatos de surtos provocados por salmonelas paratíficas no mundo, seguida pelo sorovar *Typhimurium*, com 23,5%. Ambos os sorovares têm sido extensivamente associados com aves e ovos. Tem sido relatada a contaminação pelo sorovar *Typhimurium* em cerca de 1% das cascas de ovos. O sorovar *Enteritidis* emergiu como um patógeno primário do ovo e casca de ovos na década de 1980 (HOWARD *et al.*, 2005).

Em agosto de 2010, o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão fiscalizador norte-americano de alimentos e medicamentos, realizou um *recall* de 380 milhões de ovos em quatro diferentes estados americanos, após centenas de pessoas terem sido contaminadas em um surto de salmonelose. As autoridades sanitárias acreditam que grande parte da contaminação pode ter ocorrido pela ingestão de molho de salada à base de maionese, que utiliza uma gema crua na receita (AVISITE, 2010).

## 2.8 Justificativas e objetivos

Diante da problemática da presença de *Salmonella* sp. nos ovos, da importância dessa bactéria na saúde pública ovos na alimentação humana, além do receio da população em consumir esse produto devido aos surtos da salmonelose, faz-se necessário implantar medidas de controle eficazes, visando garantir a segurança do alimento para o consumo humano. Nesse contexto, destaca-se a relevância de buscar novas metodologia que tenham rapidez de resultado, alta sensibilidade e baixo custo para a detecção da *Salmonella* sp. em ovos.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) parece ser uma estratégia útil para a detecção de bactérias do gênero *Salmonella* em diferentes substratos, como carnes, sangue, leite e ovos, com diferentes técnicas para manipulação das amostras para inativar possíveis inibidores da técnica, como sais biliares, hemoglobina e outras proteínas e componentes sanguíneos.

Portanto, para o uso da técnica da PCR é essencial a obtenção de DNA de boa qualidade para obter bons resultados em experimentos, nas quais os excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação. As extrações de DNA devem apresentar bom padrão de bandas, com quantidade e qualidade suficientes para não causar interferências nos padrões de migração em géis de eletroforese.

Isso significa que novos protocolos ainda necessitam ser testados para diferentes substratos, a fim de desenvolver novas metodologias ou até mesmo aprimorar as existentes.

Tendo em vista essas informações, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de extração de DNA genômico de *Salmonella* sp por três diferentes protocolos de extração: partículas de sílica com iodeto de sódio, partículas de sílica com DNAzol e um *kit* comercial; o substrado utilizado para a realização das extrações das gemas de ovos SPF foi contaminados artificialmente com *Salmonella* sp.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Bactérias**

A primeira etapa foi conduzida na Unidade de Estudo em Sanidade Avícola (UESA), do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas estirpes de *Salmonella* sp. e de *Escherichia coli*. As bactérias encontravam-se na forma liofilizada e foram ativadas em caldo de infusão de cérebro e coração – BHI a 37 °C por 18 horas. Após a ativação das bactérias, foi realizada a contagem das células bacterianas em câmara de Neubauer.

#### **3.2 Contaminação dos ovos**

Foram utilizados 75 ovos brancos de galinhas livres de patógenos específicos (SPF – *Specific Patogen Free*), que foram divididos em cinco grupos com 15 ovos cada. O grupo controle negativo foi inoculado com solução salina a 0,85%, estéril, na quantidade de 0,1 mL. Os demais grupos foram inoculados com culturas bacterianas, dos quais três foram inoculados com *Salmonella* sp. na concentração de  $10^5$  UFC/mL e o outro com a cepa de *E. coli* na mesma concentração de *Salmonella* sp.

Após as inoculações, todos os grupos foram mantidos à temperatura ambiente, permanecendo por um período de 24 horas. Os ovos foram

contaminados através de inoculação. Inicialmente, cada ovo foi desinfetado com uma solução de tintura de iodo a 10% no local da perfuração da casca. Os ovos foram perfurados com uma agulha estéril na região da câmara de ar. Inoculou-se, com auxílio de uma seringa de 1 mL, 0,1 mL do inóculo contendo  $10^5$  UFC por mL. Após a inoculação, os orifícios foram vedados com cola branca e os ovos incubados em temperatura ambiente.

### **3.3. Coleta das gemas**

As gemas foram colhidas assepticamente de cada grupo, colocadas em béquer estéril e homogeneizadas. Em seguida, transferiram-se 10 mL do homogeneizado de gema para tubos de centrifuga. Centrifugou-se em 2.500 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se aos sedimentos o mesmo volume do que foi descartado de solução-tampão (PBS pH 7,2); centrifugou-se novamente nas mesmas condições, descartando o sobrenadante.

O sedimento obtido de cada grupo foi armazenado a -20 °C, até o momento da extração de DNA.

### **3.4. Extrações de DNA**

Nas extrações do DNA genômico bacteriano foram utilizados dois diferentes métodos: um *kit* comercial – *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma<sup>®</sup>) e o protocolo com extração por sílica, padronizado pelo Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o *kit* comercial – *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma<sup>®</sup>), o protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 2 minutos. Em seguida, fez-se a ressuspensão celular com 180 µL de solução T e juntamente adicionaram-se 20 µL de solução de RNase. Misturou-se e esperou-se 2 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa, adicionou-se solução de proteinase K e incubou-se por 30 minutos em banho-maria em temperatura de 55 °C. Retirou-se do banho-maria e adiciona 200 µL de

solução C, incubando novamente em banho-maria por mais 10 minutos em temperatura de 55 °C. Enquanto as amostras estiveram no banho-maria, fez-se a preparação das colunas. Adiciaram-se 500 µL da solução de preparação de colunas e centrifugou-se a 12.000 g por 1 minuto, descartando-se o eluente. Retiraram-se as amostras do banho-maria, adicionaram-se 200 µL de etanol a 95% e vortequizou-se por 10 segundos. Em seguida, transferiu-se todo o conteúdo do microtubo para o tubo com as colunas e centrifugou-se à 12.000 g por 2 minutos. Descartou-se o tubo com colunas utilizado e colocou-se um novo tubo com colunas. A primeira lavagem foi feita com 500 µL da solução de lavagem 1 e centrifugada por 2 minutos a 12.000 g. Descartaram-se os tubos contendo as colunas. Na segunda lavagem foram adicionados 500 µL de solução de lavagem e centrifugou-se a 12.000 g. Descartou-se o tubo utilizado com a coluna e adicionou um novo tubo de coluna. Colocaram-se 200 µL de solução de eluição, esperando 5 minutos em temperatura ambiente, para em seguida centrifugar por 1 minuto a 12.000 g. Posteriormente às extrações, as amostras foram estocadas a -20 °C até a realização da PCR.

Todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza, por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA também foi quantificado e analisado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose. Para esse fim, um gel de agarose 1% foi preparado. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta, e as amostras foram comparadas aos padrões, determinando-se dessa maneira as concentrações aproximadas de DNA em cada amostra.

Os dois protocolos utilizados para a extração do DNA usando as partículas de sílica tiveram como diferencial o uso de diferentes reagentes para a lise celular. Esses reagentes foram: DNAzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>®</sup>) e solução de iodeto de sódio (NaI).

No protocolo, utilizando-se NaI, às amostras foram adicionados 600 µL de iodeto de sódio sob aquecimento a 55 °C e leve agitação por 5 minutos. O material obtido foi então submetido a centrifugação por 5 minutos a 12.000 g em temperatura ambiente, e o sobrenadante, coletado com auxílio de uma pipeta.

Foram, a seguir, adicionados à mistura 50 µL de suspensão de sílica (dióxido de silício – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), e a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex. A mistura foi incubada em agitador *end-over-end* (Speci-Mix, Thermolyne) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 12.000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado por inversão por tubo.

O sedimento foi lavado duas vezes com 1 ml de tampão de lavagem (etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8). Após centrifugação por 30 segundos a 14.000 g em temperatura ambiente, todo o tampão de lavagem foi removido com auxílio de uma pipeta.

Foi adicionado 1 ml de acetona e, após homogeneizado no vortex, e centrifugado por 30 segundos a 14.000 X g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta mantido a 56 °C por 10 minutos.

O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50 µL de TE (5 mM TRIS-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA pH 8), incubado a 50 °C por 5 minutos, e o tubo, centrifugado por 30 segundos a 14.000 X g em temperatura ambiente, para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Esse aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucleicos utilizando 1 µL de amostra de interesse. É ligado a um computador, que analisa os dados enviados pelo aparelho e estima a quantidade de DNA na amostra em µg/µL e a qualidade do material pelo valor obtido na razão  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$ .

As amostras foram transportadas em garrafas térmicas com nitrogênio líquido da EV-UFGM para o Laboratório de Hematozoários – BIOAGRO – UFV, e mantidas a -20 °C até a realização da PCR.

### **3.5. PCR**

Com as alíquotas de cada amostra de DNA, obtidas dos dois diferentes protocolos de extração, foram realizadas as reações de amplificação, com volume final de 25 µl contendo: 2 µl de DNA, 5 ml de tampão 10X (200mM Tris-

HCl pH 8, 500 mM KCL), 0,3 ml de DNTP a 10 mM (Datp, dTTP, Dctp, Dgtp – Invitrogen), 2,5 ml de MgCl<sup>2</sup> a 50 mM, 1 ml de cada iniciador a 25 pmol de cada , 0,3 ml taq polimerase a 1U/ml e 12,9 ml de água ultrapura q.s.p.

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do DNA foi sintetizado com base na sequência: 5' GTA AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' (*primer 1*) e 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3' (*primer 2*), amplificando um fragmento de 284 pares de base do gene *invA* de *Salmonella* sp.

A reação PCR foi realizada em termociclador. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento por 60 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 30 segundos, além de uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Em cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de culturas puras de *Salmonella* sp. Foi utilizado um controle negativo contendo reagentes sem inclusão de uma amostra de DNA .

A detecção dos produtos da PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para isso, 0,5 g de agarose foi adicionado a 50 mL de tampão TBE 1X e aquecido em micro-ondas até a completa dissolução. Logo após a dissolução, foram adicionados 3 mL de brometo de etídio (15 µL de 1mg/L da solução-estoque de brometo de etídio) à solução de agarose.

A solução foi misturada e depositada sobre uma bandeja. Um pente de 25 poços foi colocado no gel antes de sua solidificação, e este foi removido logo após a solidificação.

A cada 5 µL de produto amplificado foi adicionado 1 µL do tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE e azul de bromofenol) na concentração de 5X; essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1%. A eletroforese ocorreu em 100V em tampão TBE 1X (Tris-base pH 8, EDTA e ácido bórico), utilizando o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). Posteriormente à corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 mg/ml, e os resultados, revelados com auxílio de um transiluminador UV.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de ácidos nucleicos pode ser efetuada por métodos que variam nos seus princípios de funcionamento, rendimento, tempo de execução e qualidade dos ácidos nucleicos obtidos. Com base nesse princípio, foram testados três diferentes protocolos de extração de DNA da bactéria *Salmonella* sp. em amostras de ovos de galinha contaminados artificialmente, sem utilizar meios de pré-enriquecimento antes da extração do DNA.

Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares (e conseqüente exteriorização do DNA). A segunda fase é a purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (restos de membrana, proteínas, RNA) (ROMANO, 1999).

Após a obtenção do lisado, há necessidade de separar os ácidos nucleicos das outras moléculas. Isso foi feito através das partículas de sílica; o princípio dessa técnica de extração de DNA baseia-se nas ligações que ocorrem entre a superfície das partículas de sílica e do DNA na presença de sais sob determinadas condições de pH. A propriedade de ligação do DNA com a sílica faz com que essa substância possa ser usada na purificação de ácidos nucleicos.

Boom *et al.* (1990) desenvolveram um protocolo utilizando partículas de sílica e agentes caotrópicos para purificação de DNA e RNA a partir de soro e



urina humanos, verificando a efetividade dessas substâncias na ruptura ou lise das membranas celulares.

Segundo Rohland e Hofreiter (2007), o método de extração utilizando partículas de sílica apresenta algumas vantagens sobre outros protocolos por ser rápido e fácil; utilizar-se de pequenas quantidades de amostra; e ser muito fácil de implementar, pois utiliza equipamentos-padrões de laboratório e poucos produtos químicos. Além disso, possui eficiente remoção de inibidores para PCR.

Nessa pesquisa, os protocolos que usaram as partículas de sílica para a separação e captação do DNA demonstram que essa metodologia foi eficaz, simples, rápida, fácil, com boa amplificação do DNA e baixo custo. Esses resultados são relevantes quando comparados aos de outros métodos, que muitas vezes utilizam compostos prejudiciais a saúde, como é o caso do fenol-clorofórmio: isoamil, utilizado em outros protocolos.

De acordo com a Tabela 1, todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro Mano drop.

Tabela 1 – Concentração e pureza das amostras de DNA extraído, de acordo com os dois protocolos que utilizaram as partículas de sílica

Amostra	Concentração	Pureza
S0 <sub>DNAzol</sub>	56 µg/µl	1,25
S1 <sub>DNAzol</sub>	56 µg/µL	1,03
S2 <sub>DNAzol</sub>	33 µg/µL	1,03
S3 <sub>DNAzol</sub>	53,5 µg/µL	1,02
EC <sub>DNAzol</sub>	59,5 µg/µL	1,02
D <sub>DNAzol</sub>	80,0 µg/µL	1,03
S0 <sub>Nal</sub>	54,0 µg/µL	1,66
S1 <sub>Nal</sub>	108,0 µg/µL	1,00
S2 <sub>Nal</sub>	90,0 µg/µL	1,03
S3 <sub>Nal</sub>	86,5 µg/µL	1,66
EC <sub>Nal</sub>	88,0 µg/µL	1,03
D <sub>Nal</sub>	56,0 µg/µL	1,05

S0<sub>DNAzol</sub>, S1<sub>DNAzol</sub>, S2<sub>DNAzol</sub>, S3<sub>DNAzol</sub> = alíquotas de gemas de ovos contaminadas com *Salmonella* sp.

EC<sub>DNAzol</sub> = alíquotas de gema de ovos contaminadas com *E. coli*.

D<sub>DNAzol</sub> = controle negativo.

S0<sub>Nal</sub>, S1<sub>Nal</sub>, S2<sub>Nal</sub>, e S3<sub>Nal</sub> = alíquotas de gemas de ovos contaminadas com *Salmonella* sp.

EC<sub>Nal</sub> = alíquotas de gema de ovos contaminadas com *E. coli*.

D<sub>Nal</sub> = controle negativo.

Apesar de ter sido possível a extração do DNA bacteriano, esta ainda não foi a desejada, pois as amostras apresentaram valores inferiores a 1,8, indicando contaminação do DNA por proteínas.

Neste estudo não foi possível visualizar as amostras de DNA extraídas do *kit* comercial; portanto, não transmite segurança quanto à certeza da extração, além de ter um custo elevado. O DNA foi quantificado e analisado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose.

Conforme Mesquita *et al.* (2001), nas técnicas de extração de DNA, a primeira fase representa a ruptura ou lise das membranas celulares, com o objetivo de liberar os componentes citoplasmáticos e/ou nucleares intracelulares. Entre as metodologias utilizadas com essa finalidade, têm-se a fervura, a digestão enzimática (proteínase K, lisozima), a ruptura mecânica (homogeneização), as ondas sonoras (sonicação), os detergentes (SDS, Triton X-100) e soluções (solução salina hipotônica), na dependência do tipo da amostra ou célula. Além das diferentes substâncias, o tempo no qual as células ficam em contato e as concentrações das substâncias influenciam na qualidade/quantidade final de DNA extraído. Isola *et al.* (1994) verificaram que a digestão com proteínase K em baixa concentração e por longo período de tempo (3-5 dias) determina uma qualidade/quantidade final de DNA melhor que a digestão com proteínase K em alta concentração e por curto período de tempo.

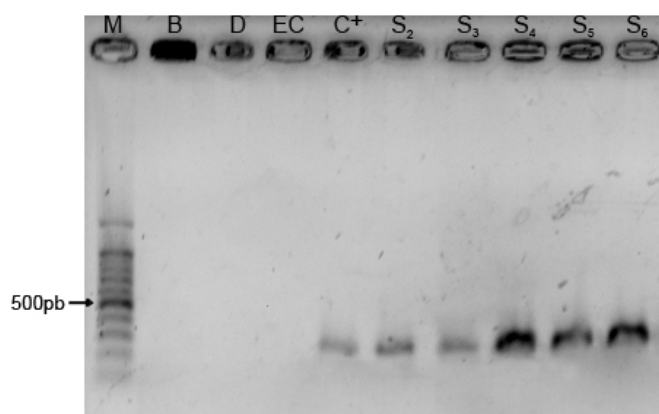
Mesquita *et al.* (2001) testaram diferentes protocolos para a extração de DNA em material parafinado e não parafinado. Foram utilizados em dois de seus protocolos a proteínase K em baixa concentração e por longo tempo e no protocolo de sílica, em que não se utilizou a proteínase K e foi realizado em curto período de tempo; este resultou em baixa quantidade de DNA e alta quantidade de proteína. Esse fato pode representar a causa mais provável da não amplificação pela PCR do DNA obtido com esta metodologia de extração.

Flores *et al.* (2001) compararam dois métodos de extração de DNA – a extração por tratamento térmico e a técnica de extração pelo fenol-clorofórmio – em amostras de 100 ovos de galinha contaminados artificialmente com uma cepa de ST. O material obtido com as extrações foi submetido a PCR. Comparando os métodos de extração, observou-se diferença na capacidade de detecção superior a favor do fenol-clorofórmio.

Rohland e Hofreiter (2007) projetaram um método para a recuperação do DNA amplificável por PCR, de ossos antigos e peças de dentes. Esse método consiste em uma combinação de extração de DNA a partir de pó de osso através de EDTA e proteinase K com a purificação do DNA através da ligação à sílica na presença de altas concentrações de tiocianato de guanidina. Além disso, a etapa de purificação remove vários tipos de inibidores de PCR presentes em amostras de ossos antigos, otimizando assim a quantidade do DNA antigo disponível para manipulações enzimáticas subsequentes, como a PCR. Esses pesquisadores concluíram que esse protocolo permite a extração de DNA de ossos antigos e dos dentes com um mínimo de etapas de trabalho e equipamentos e produz extratos de DNA no prazo de dois dias úteis.

Germini et al. (2008) descreveram quatro diferentes procedimentos de extração de DNA para detecção de ST, *Listeria monocitogenes* e *E. coli* em ovos. O melhor desempenho foi o do método que utiliza uma solução de resina quelante (Chelex<sup>®</sup>) para a lise celular.

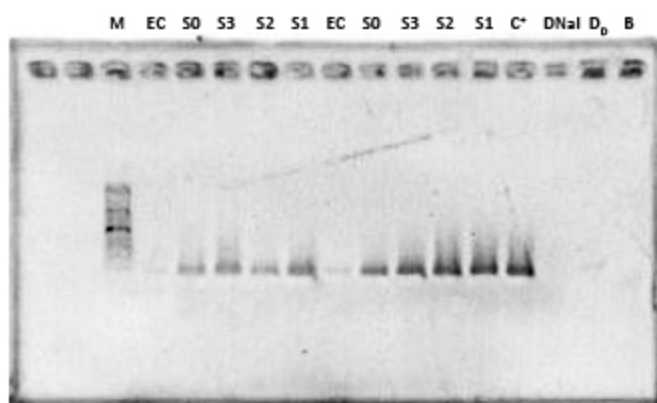
Após as extrações do DNA, foi realizada a PCR. Para esta técnica foram utilizados os *primers* iniciadores derivados do gen *invA*, obtendo-se uma banda de amplificação de DNA com 284 pares de base, como esperado, em todas as amostras de DNA de *Salmonella* sp. analisadas por PCR; não foi observada nenhuma amplificação de DNA da amostra *E. coli*. Com isso, pode-se confirmar que o gene *invA* contém sequências únicas de *Salmonella*, demonstrando ser um alvo adequado para PCR, com potencial para aplicações em diagnóstico de *Salmonella* sp.



M = marcador 100 pb; B = branco; D = diluente; EC = *E. coli*; C<sup>+</sup> = controle positivo; S2, S3, S4, S5 e S6 = amostras de gemas de ovos contaminadas por *Salmonella* sp.

Figura 1 – Resultado da PCR, que utilizou o *kit* GenElute Bacterial Genomic DNA para a extração do DNA bacteriano.

O melhor resultado foi obtido quando o DNA foi extraído pelo método de partículas de sílica associados com o NaI (iodeto de sódio), fato evidenciado pela presença de bandas mais intensas de DNA, indicando maior presença de material genético. Assim, a extração de DNA por esse método pode ser utilizada com segurança nos ensaios da PCR, reduzindo-se, dessa forma, os custos da técnica, principalmente no que se refere à aquisição de *kits* de extração de DNA.



M = marcador de 100 pb; EC = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com o reagente DNAzol de amostras de gemas de ovos contaminados por *E. coli*; SO, S3, S2 e S1 = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com o reagente DNAzol de amostras de gemas de ovos contaminados por *Salmonella* sp.; EC<sub>2</sub> = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com iodeto de sódio de amostras de gemas de ovos contaminados por *E. coli*; SO<sub>2</sub>, S3<sub>2</sub>, S2<sub>2</sub> e S1<sub>2</sub> = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com iodeto de sódio de amostras de gemas de ovos contaminadas por *Salmonella* sp.; C<sup>+</sup> = controle positivo; D<sub>DNAzol</sub>; D<sub>D</sub> = controle negativo; e B = branco.

Figura 2 – Resultado da PCR obtido da extração de DNA de *Salmonellas* sp. em gemas de ovos contaminados artificialmente.

Hoorfar *et al.* (1999) relataram que a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas, evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica. Segundo Gálan *et al.* (1992), o *invA* é um gene comum à maioria dos sorotipos de *Salmonella*, que codifica uma proteína de invasão celular e, ausente na região correspondente de *E. coli*. Portanto, esse gene é considerado eficiente para distinguir *Salmonella* de outras bactérias.

Ranh *et al.* (1992) realizaram ensaios de especificidade e seletividade com iniciadores derivados deste gene e testaram 630 amostras de salmonelas e 142 amostras de diferentes microrganismos, verificando amplificação em todas as amostras de DNA de *Salmonella*, exceto *S. litchfield* e *S. senftenberg*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Santos et al. (2002), que usaram iniciadores derivados do gene *invA* para avaliar a especificidade, seletividade e sensibilidade para utilização na técnica da PCR. Os resultados comprovaram que esses iniciadores são específicos, pois não produziram sinais de amplificação com amostras de DNA humano e de galinha, bem como de microrganismos não *Salmonella*. Somente com a amostra de DNA de *E. coli* foi verificada uma banda de amplificação de cerca de 300 pb.

Gallegos-Robles et al. (2009) demonstraram a amplificação do gene *invA* através da PCR para detecção de *Salmonella* em amostras de carne crua, como uma alternativa ao método convencional de cultura. Contudo, foi necessária a etapa do pré-enriquecimento, para ocorrer um crescimento do microrganismo-alvo e, com isso, aumentar a sensibilidade da PCR. No entanto, no presente estudo, dispensou-se a etapa do pré-enriquecimento, o que não afetou a obtenção de resultados promissores e confiáveis.

Flores et al. (2001) concluíram que o método da PCR é tão eficiente quanto o bacteriológico, com custo e tempo significativamente menores. Uma vez que não há necessidade de ter células viáveis para obter a PCR positiva, pode-se aumentar o número de amostras positivas em relação às obtidas no bacteriológico.

Um dos fatores limitantes para a detecção de agentes microbianos através da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais, é a presença de substâncias que inibem ou reduzem a eficiência da amplificação, como sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteínases no leite e ureia na urina; por esse motivo, diferentes técnicas são empregadas para diminuir a inibição da PCR e/ou para separar as bactérias dos inibidores da PCR (ANDRADE et al., 2010).

A indústria avícola tem comprovado que a utilização de métodos rápidos, principalmente a técnica de PCR, torna ágil o rastreamento, além de promover grau de sensibilidade maior que o do método tradicional dentro de sua proposta, em busca da detecção das principais linhagens importantes para o setor avícola (*S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium*) (NASCIMENTO; PONTES, 2004).

Segundo Navarro (1994), a detecção e identificação adequada de *Salmonella* sp. são partes fundamentais no controle e prevenção da infecção. A

identificação rápida e precisa ajudará na erradicação, mediante a destruição oportuna de aves infectadas, na implementação de controle em lotes infectados e na prevenção em lotes suscetíveis. Dessa forma, deve-se detectar a presença de *Salmonella* sp no meio ambiente (cama), nas aves (órgãos internos) e em amostras de ovos frescos ou embrionados, sendo essa a maneira mais direta de demonstrar que um lote de aves está transmitindo a bactéria através dos ovos.

## 5. CONCLUSÃO

O uso do protocolo que utilizou as partículas de sílica, associado com o iodeto de sódio e o reagente Dnazol, permitiu a extração e a obtenção de um DNA genômico de *Salmonella* de qualidade satisfatória, porém, novos estudos devem ser conduzidos com a finalidade de aprimorar essa técnica de extração de DNA.

Essa metodologia pode ser considerada também economicamente mais interessante, porque os reagentes utilizados são de preços acessíveis e comuns em laboratórios, e permite a obtenção de amostras de moléculas de DNA de *Salmonella* sp. de qualidade, diminuindo erros e repetições na etapa de amplificação, bem como gastos desnecessários com reagentes do PCR e o uso de outros *kits* adicionais para purificação do DNA obtido, quando comparada aos métodos convencionais disponíveis na literatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORTEZ, A. L. C. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves.** 80 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2006.

ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; ONDER, L. P. D.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A. A. L.; BRITO, B. G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp.; *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ANDRETTI FILHO, R. L.; FERNANDES, S. A.; BORETTI, L. P.; BARROS, M. R.; DEL BEM, S. M.; FONTANA, A.; SAMPAIO, H. M.; SAVANO, E. N. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada, Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 4, p. 90-101, 2001.

ÁVILA, L. A. F. Controle de *Salmonella* – um desafio para a indústria avícola brasileira. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, Balneário Camboriú, SC, 2007.

AVISITE. Disponível em: <URL:<http://www.avisite.com.br>>. Acesso em: 5 set. 2010

BACK, A. **Manual de doenças de aves.** Cascavel, PR, 2002. 246 p.

BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. **Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos.** In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, SC. 7., 2006.

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



BARROW. P. A. A Salmonella control – past, present and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-669, 1993.

BARROW, P. A. Salmonella infections in poultry – problems and new thoughts on the possibilities of control. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, v. 1, p. 9-16, 1999.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 3, p. 219-223, 2001.

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

BERCHIERI JR. A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-195.

BOMM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, P. M.; WERTHEIM, P. M. E.; NOORDAA, J. V. D. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, 1990.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer Science, 2008. p. 201-216.

BRADSHAW, J. G.; SHAH, D. B.; FORNEY, E., MADDEN J. M. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. **Journal Food Protection**, v. 53, p. 1033-1036, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. **Normas gerais de inspeção de ovos e derivados**. Brasília, 1990.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 9 de janeiro de 2002. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria da Defesa Agropecuária. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como Livres de *S. gallinarum* e de *S. pullorum* e Livres ou Controlados para *S. enteritidis* e para *S. typhimurium*. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 9 de janeiro de 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Relatório do Monitoramento da Prevalência do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas isolados de carcaças de frango congelados comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana em Frangos – PREBAF, 2008.

CAMPOS, L. C. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I.; GAMA, N. M. S. Q. Pesquisa de *Salmonella* sp. em ovos comerciais, analisados no laboratório de patologia avícola de Descalvado, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 76-79, 2002.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M- cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 724-731, 1998.

COOPER, G. L.; NICHOLAS, R. A. J.; BRACEWELL, C. D. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected *Salmonella enteritidis*. **Veterinary Record**, v. 125, p. 567-572, 1989.

CORREIA, W. M.; CORREIA, C. M. Paratífos em geral. In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p. 167-74.

CVE/SP – CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. 2001. **Informe-Net DTA - Doenças transmitidas por alimentos e água: *Salmonella enteritidis*/Salmoneloses**. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/dta\\_menu.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/dta_menu.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2009.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILOTTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, B. W.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v. 12, n. 13, p. 5-10, 2005.

DUNKLEY, K. D.; CALLAWAY, T. R.; O'BRYAN, C.; KUNDINGER, M. M.; DUNKLEY, C. S.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Cell yields and fermentation responses of a *Salmonella typhimurium* poultry isolate at different dilution rates in an anaerobic steady state continuous culture. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 537-544, 2009.

EKPERIGIN, H. E.; NAGAJARA, K. V. *Salmonella*. In: VASSALO, J. **The veterinary clinics of North America: food animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p. 17-29.

FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica e aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artemed, 2002. 424 p.

FLÔRES, M. M.; NASCIMENTO, V. P.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. R.; LOPES, R. F. F.; BEAT, V., BARBOSA, T. M. C. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da Polimerase. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, 2003.

FLORESTA, F. A. **Condições para a indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

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

GALÁN, J. E. *Salmonella* interaction with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 53-86. 2001.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.J.; IMMERSSEEL, F.V. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*, **FEMS – Microbiology Reviews** v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009.

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, USA, p. 81-120, 1997.

GALLEGOS-ROBLES, M. A.; LOREDO, A. M.; ALVAREZ, O. J. A.; GARCIA, O.; MAETINEZ, L. A.; RAMOS, L. H.; FRATAMICO, P. PCR Detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v. 20, p. 733-738, 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GOLDEN, N. J.; MARKS, H. H.; COLEMAN, M. E.; SCHROEDER, C. M.; BAUER, N. E.; SCHLOSSER, W. D. Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 215-228, 2008.

GOMES, M. J. P. **Enterobacteriácias (*Salmonella* spp)**. Bacteriologia da FAVET, UFGRS. Microbiologia clínica. 2008. Disponível em: <<http://www.ufgrs.br/labactev>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

GUAN, I.; GRENIER, C.; BROOKS, B. W. In vitro study of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* definitive type 104: survival in egg albumen and penetration through the vitelline membrane. **Poultry Science**, v. 85, p. 1678-1681, 2006.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity island of *Salmonella enterica*. **Inter. J. Med. Microbiol.**, v. 294, p. 95-102, 2004.

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

HOWARD, Z. R.; MOORE, R. W.; ZABALA-DIAZ, I. B.; LANDERS, K. L.; BYRD, J. A.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; BIRKLHOL, S.G.; RICKE, S. C. Ovarian laying hen follicular maturation and in vitro *Salmonella* internalization. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 95-100, 2005.

HUMPHREY, T. J.; CHART, H.; BASKERVILLE, A.; ROWE, B. The influence of age on the response of SPF hens to infections with *Salmonella enteritidis* PT4. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 33-43, 1991.

IANKOV, I. D.; PETROV, D. P.; MLANDENOV, I. V.; HARALAMBICVA, I. H.; KALEV, O. K.; BALABANOVA, M. S.; MITOV, I. G. Protective efficacy of IgA monoclonal antibodies to O and H antigens in a mouse model of intranasal challenge with *Salmonella enterica* serotype *enteritidis*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 6, p. 601-910, July, 2004.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am. J. Pathol.**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JITRAPAKDEE, S.; TASSANAKAJON, A.; BOONSAENG, V.; PIANKIJAGUN, S.; PANYM, S. A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 375-382, 1995.

LEITÃO, M. F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. p. 181-190.

LISTER, S. A. *Salmonella enteritidis* in broiler and broiler breeders. **Veterinary Record**, v. 123, 350 p. 1988.

MALORNY, R.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 245-251, 2007.

MARCUS, S. L.; BRUMELLA, J.H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **Bacteriologia y Virologia Veterinaria**, 3. ed. Zaragoza. Acribia, 1980. p. 299-322.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontologia Brasileira**, v. 15, n. 4, 2001.

MIYAMOTO, T.; KITAOKA, D.; WITHANAGE, G. S.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella enteritidis* oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 43, n. 3, p. 497-505, 1999.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. *Salmonella enteritidis*: Implicação em saúde pública e na qualidade dos produtos de origem avícola, 2006. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc\\_publicacao\\_r6p21z7.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc_publicacao_r6p21z7.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2007.

NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C. T. P. O ovo. In: **Manejo da incubação**. Jaboticabal: Facta, 2003, p. 35-49.

NASCIMENTO, V. P.; PONTES, A. P. Salmonelose – a tecnologia do DNA como ferramenta de controle. **Revista Sanidade Avícola, UFRGS**. Disponível em: <[www.avisite.com.br/cet/1/12/index.shtml](http://www.avisite.com.br/cet/1/12/index.shtml)>. Acesso: em 13 fev. 2009.

NAVARRO, M. P. Métodos de laboratório para la detección de *Salmonella enteritidis* y programas de seguimiento en reproductoras pesadas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR 8., Athens. **Anais...** Athens: AMEVEA, 1994. p. 365-389.

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

OLIVEIRA, M. C. S.; REGINATO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTIO, W. H. B. **Fundamentos teóricos práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L.C.; GOULDING, J. S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar., 2000.

PINTO, A. T.; SILVA, E. N.; SANTOS, C. R. Boas práticas operacionais em sala de classificação de ovos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, São Paulo. **Anais...** São Paulo. 2004. p. 63.

PINTO, A.T.; SILVA, E.N. Ensaio de penetração de *Salmonella enteritidis* em ovos de galinha com diferentes qualidades de casca, submetidos ou não a lavagem industrial e a duas temperaturas de armazenagem. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1196-1202, 2009.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann – White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 173-174, 2003.

RAHN, K. ; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWE, S. A.; GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C. L. Amplification of invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271-279, 1992.

ROHLAND, N.; HOFREITER, M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, 2007.

RODRIGUES, T. O inimigo número um. **Avicultura Industrial**, v. 85, n. 1019, 1995.

RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* sp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Santos, São Paulo. **Anais...** Campinas: Facta, v. 2, p. 223-228, 2005.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILLOTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**. v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.

SANTOS, B. M. Salmoneloses. In: **Principais doenças bacterianas das aves**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. v. 9. 14 p.

SESTI, L. A. Filosofia e conceitos de biossegurança e doenças com potencial de risco para a avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: Facta, v. 1, p. 47-91, 2001.

SILVA, E. N. Doenças de transmissão vertical. In: **Manejo da incubação**. Jaboticabal: Facta, p. 379- 393, 2003.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 4, n. 2, 2002.

SONCINI, R. A.; BITTENCOURT, F. L. Contaminação dos ovos após a postura. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Ed.). **Manejo da Incubação**. Campinas: Facta, 2003. p. 433-453.

SNOEYENBOS, G. H. Pullorum disease. In: HOFSTAD, M. S. **Disease of Poultry**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1984. p. 66-79.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; PERESI, J. T. M.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1041-1044, 2002.

TERRA, C. O ovo é saudável. **Aves e Ovos**, v. 16, 2001. 36 p. (Número especial)

TÉO, C. R. P. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. *Salmonella* sp. O ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 195-210, 2005.

UBA (União Brasileira de Avicultura) Relatório Anual UBA – 2009. Disponível em: <[www.abef.com.br/portal/\\_clientes/abef/cat/Anuario\\_baixa\\_Resolucao.pdf](http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Anuario_baixa_Resolucao.pdf)>. Acesso: 23 out. 2010.

URUEÑA, A. C. Diagnóstico serológico de salmonelosis. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León, Octubre, 2003.

VALLE, R. H.; BRESSAN, M. C.; CARVALHO, E. P. *Tecnologia de ovos*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 86 p.