

MICHELLE VIEIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ALVO E PCR EM DIFERENTES ETAPAS DA  
METODOLOGIA CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.  
EM CARNE BOVINA ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA**

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  
2012

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

T

A447a  
2012

Almeida, Michelle Vieira de, 1988-

Avaliação de sequências alvo e PCR em diferentes etapas da metodologia convencional para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina artificialmente contaminada / Michelle Vieira de Almeida. – Viçosa, MG, 2012.  
xi, 72f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Luis Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 66-72.

1. *Salmonella*. 2. Reação em cadeia de polimerase.  
3. Carne bovina. 4. Carne - Inspeção. 5. Alimentos de origem animal - Contaminação. 6. Microorganismos patogênicos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 579.344

MICHELLE VIEIRA DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ALVO E PCR EM DIFERENTES ETAPAS DA  
METODOLOGIA CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.  
EM CARNE BOVINA ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA**

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: 06 de Novembro de 2012.

---

Luciano dos Santos Bersot

---

Abelardo Silva Júnior  
(Co-orientador)

---

Luís Augusto Nero  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe Solange, por sempre me apoiar.

Ao professor Nero, por ter me orientado durante cinco anos, desde a iniciação científica até o mestrado, pela atenção, confiança e por sempre estar disposto a ajudar-me.

Ao professor Abelardo, meu co-orientador, por sua ajuda ter sido essencial durante este trabalho.

Ao professor Luciano, por ter aceitado o convite de participar da banca examinadora e cedido diversos isolados de *Salmonella* spp. utilizados neste trabalho.

À professora Paula, por ter me ensinado muito, principalmente durante meu tempo como monitora.

Aos professores que tive durante a graduação e mestrado na UFV, por contribuírem para meus conhecimentos e formação profissional.

Ao meu namorado Luiz, por ter estado ao meu lado, mesmo que à distância grande parte do tempo.

Aos meus amigos Rodrigo, Japa, Gabi, Luana e Paulinha pela companhia, risadas, comilanças e força.

Aos funcionários do DVT, principalmente Luis, Dagô e Rosi, por estarem sempre presentes, facilitando a vida e a pesquisa de todos.

Ao Mococa, por sua colaboração em várias etapas do projeto e pelos momentos de descontração.

Ao Ricardo, João Paulo, Raquel e Thalita por ajudarem como estagiários.

Aos colegas do LIPOA e do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública.

Aos amigos Bergo, Knegt, Jú Bióloga, David, Teresa e Samuelly, por terem feito parte da minha vida durante esta etapa.

À CAPES e CNPq pelo financiamento.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

## CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. Características do gênero <i>Salmonella</i> .....	1
2. Importância de <i>Salmonella</i> spp. em alimentos .....	6
3. Metodologias de detecção de <i>Salmonella</i> spp. em alimentos .....	11
3.1. Metodologias convencionais .....	11
3.2. Metodologias alternativas.....	15
REFERÊNCIAS .....	21
OBJETIVOS.....	40
ARTIGO: Avaliação de sequências alvo e PCR em diferentes etapas da metodologia convencional para detecção de <i>Salmonella</i> spp. em carne bovina artificialmente contaminada.....	41
RESUMO.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.1 Avaliação de oligonucleotídeos iniciadores na detecção de <i>Salmonella</i> spp. por PCR .....	45
2.1.1 Cepas bacterianas de referência e isolados de campo .....	45

2.1.2 Condições de cultivo e preparo das amostras de DNA .....	46
2.1.3 Oligonucleotídeos iniciadores.....	49
2.1.4 Eficiência dos protocolos de PCR .....	49
2.1.5 Sequenciamento dos produtos de PCR .....	51
2.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp. por PCR em etapas de enriquecimento de carne bovina artificialmente contaminada .....	54
2.2.1 Amostras de carne e inoculação de <i>Salmonella</i> sp.....	54
2.2.2 Detecção convencional de <i>Salmonella</i> spp.....	55
2.2.3 Detecção de <i>Salmonella</i> por PCR.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
3.1. Avaliação de oligonucleotídeos na detecção de <i>Salmonella</i> spp. por PCR.....	57
3.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp. por PCR em etapas de enriquecimento de carne bovina artificialmente contaminada .....	60
4. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS .....	66

## **LISTA DE FIGURAS**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Figura 1. Esquema da biogênese dos vacúolos contendo <i>Salmonella</i> (SCV).....	5
---	---

### **ARTIGO**

Figura 1. Detecção de <i>Salmonella</i> sp. por PCR em caldos de enriquecimento de amostras de carne bovina artificialmente contaminada.....	61
--	----



## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Frequência de <i>Salmonella</i> spp. em produtos cárneos em diferentes regiões do Brasil.....	9
---	---

### ARTIGO

Tabela 1. Cepas de <i>Salmonella</i> e não- <i>Salmonella</i> utilizadas.....	47
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores avaliados na detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	52
Tabela 3. Condições de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	53
Tabela 4. Indicadores de validade calculados para os oligonucleotídeos iniciadores testados.....	59
Tabela 5. Frequência de resultados positivos para <i>Salmonella</i> sp. em carne bovina artificialmente contaminada.....	60

## RESUMO

ALMEIDA, Michelle Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2012. **Avaliação de sequências alvo e PCR em diferentes etapas da metodologia convencional para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina artificialmente contaminada.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Abelardo Silva Júnior.

*Salmonella* spp. estão entre os principais causadores de toxinfecções alimentares em todo o mundo, estando associados à ingestão de alimentos de origem animal contaminados, como carne, ovos e leite. Os métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* spp. são laboriosos e requerem vários dias para obtenção de resultados, o que determina a necessidade de desenvolvimento e avaliação de metodologias mais sensíveis, específicas e rápidas, como a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). Neste trabalho, foram avaliados seis pares de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *Salmonella* por PCR: 139/141 (que tem como alvo uma região conservada do gene *invA*), OMPCF/OMPCR e S18/S19 (gene *ompC*), LHNS-531/RHNS-682 (gene *hns*), ST11/ST15 (fragmento cromossomal randômico) e SIFBF/SIFBR (gene *sifB*). Diversos isolados de *Salmonella* spp. e de outros micro-organismos foram utilizados na determinação da eficiência dos oligonucleotídeos. O par SIFBF/SIFBR apresentou o melhor desempenho, com amplificação da região alvo em todos os isolados de *Salmonella*, e ausência de resultados falsos positivos e bandas inespecíficas. Considerando esses resultados, os oligonucleotídeos SIFBF e SIFBR foram selecionados e utilizados no desenvolvimento de um protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em diferentes etapas de enriquecimento da metodologia convencional de detecção, em amostras de carne bovina artificialmente inoculadas com o patógeno nas concentrações aproximadas de  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC/25 g. Embora não tenha sido possível a detecção de *Salmonella* spp. nas amostras antes do enriquecimento, o protocolo foi capaz de detectar o patógeno em todas as etapas de enriquecimento da metodologia convencional: Água Peptonada Tamponada após 18 h de incubação, caldo Soja Rappaport-Vassiliadis e caldo Müller-Kauffmann Tetracionato Novobiocina. Esses resultados indicam que o protocolo proposto foi viável para detectar *Salmonella* spp. em carne bovina

em etapas intermediárias da metodologia convencional de isolamento, reduzindo substancialmente o tempo requerido para obtenção de resultados finais. Estudos complementares são necessários para avaliação do protocolo em sistemas cárneos contaminados naturalmente por *Salmonella* spp.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Michelle Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2012. **Evaluation of target sequences and PCR in different stages of conventional methodology for detection of *Salmonella* spp. in artificially contaminated beef.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Abelardo Silva Júnior.

*Salmonella* spp. are a major cause of foodborne disease worldwide and are associated with the ingestion of contaminated animal origin food, such as meat, eggs and milk. Traditional methods for detection of *Salmonella* spp. are laborious and require several days to obtain results; because of this, the development and evaluation of methodologies that are more sensitive, specific and rapid, such as the Polymerase Chain Reaction (PCR), are needed. In this study, we evaluated six primer pairs for *Salmonella* detection by PCR: 139/141 (targeting a specific region of *invA* gene), OMPCF/OMPCR and S18/S19 (*ompC* gene), LHNS-531/RHNS-682 (*hns* gene), ST11/ST15 (chromosomal random fragment) and SIFBF/SIFBR (*sifB* gene). Several isolates of *Salmonella* spp. and other microorganisms were used for determining the efficiency of the primers. SIFBF/SIFBR primer pair presented the best performance because it amplified the target region in all *Salmonella* isolates, and didn't yield any false positives or nonspecific bands. Considering these results, SIFBF and SIFBR primers were selected and used to develop a PCR assay for *Salmonella* spp. detection at different enrichment steps of the conventional detection method, in beef samples artificially inoculated with this pathogen at approximate concentrations of  $10^1$ ,  $10^2$  and  $10^3$  CFU/25 g. Although it was not possible to detect *Salmonella* spp. in the samples before enrichment, the protocol was capable of detecting the pathogen in all enrichment steps of the conventional methodology: Buffered Peptone Water after 18 h incubation, Rappaport-Vassiliadis Soya Broth and Müller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth. These results indicate that the proposed protocol was viable to detect *Salmonella* spp. in beef in intermediate stages of the conventional isolation protocol, substantially reducing the time required to obtain final results. Additional studies are

necessary to evaluate the proposed protocol in meat naturally contaminated with *Salmonella* spp.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à Família Enterobacteriaceae. São móveis por flagelos peritríquios, com exceção aos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Nos testes bioquímicos, são positivos para citrase, lisina descarboxilase e produção de H<sub>2</sub>S, e negativos para oxidase, urease e indol (Downes e Ito, 2001). Geralmente não fermentam lactose, sacarose ou salicina, mas fermentam glicose e outros monossacarídeos, com produção de gás (Jay et al., 2005). A incidência de cepas lactose positivas é baixa, uma vez que sua ocorrência é esporádica e sua identificação nos meios seletivos geralmente usados é difícil (Kumar et al., 2009). A faixa de pH ótima para multiplicação é entre 6,6 e 8,2, e valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0 possuem efeito bactericida. *Salmonella* spp. conseguem multiplicar-se a temperaturas entre 6 e 45°C, e em meios com atividade de água (a<sub>w</sub>) superior a 0,94 (Jay et al., 2005).

A compreensão da taxonomia do gênero *Salmonella* e sua nomenclatura passaram por diversas mudanças (Agbaje et al., 2011, Brenner et al., 2000, Grimont e Weill, 2007, Tindall et al., 2005). Atualmente, o gênero compreende duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta última é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Os sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* mais prevalentes são

designados por nomes, como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Schwarzengrund*. Os sorovares restantes são designados por suas fórmulas antigênicas, resultantes da caracterização dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) por sorotipagem. Essas fórmulas antigênicas são listadas no Esquema White-Kauffmann-Le Minor, cuja atualização é responsabilidade do *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella*, no Instituto Pasteur, Paris, França (Grimont e Weill, 2007). Em sua última atualização, o número de sorovares listados chegou a 2.610 (Guibourdenche et al., 2010).

Uma classificação simplificada dos sorovares de *Salmonella* spp. seria a divisão em tifóide e não tifóide. O primeiro grupo seria composto por *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, agentes causadores da febre entérica. O segundo grupo abrangeria todos os outros sorovares (Sánchez-Vargas et al., 2011).

Outra classificação utilizada é a divisão dos sorovares em três grupos, de acordo com sua adaptação a hospedeiros: (I) sorovares adaptados ao homem e a primatas superiores, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi*; (II) sorovares adaptados principalmente a determinados animais, como *S. Dublin* em bovinos, *S. Gallinarum* em galinhas, *S. Abortusequi* em equinos e *S. Abortusovis* em ovinos; (III) e outros sorovares que não são adaptados a hospedeiros específicos, infectando humanos e uma variedade de animais, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Agbaje et al., 2011, Jay et al., 2005).

Além dessas, existem diversas outras classificações para os sorovares do gênero *Salmonella*, baseadas principalmente em patogenia, infecção e hospedeiros (Gyles et al., 2011).

Os membros do gênero *Salmonella* são geneticamente próximos, mas a aquisição e perda de elementos genéticos, como plasmídeos e profagos, levaram à evolução dos diferentes sorovares (Sabbagh et al., 2010).

No genoma de *Salmonella* spp. existem vários genes associados à fatores de virulência, e muitos estão próximos uns dos outros em grupos chamados de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPIs - "*Salmonella Pathogenicity Islands*"). Cerca de 21 SPIs já foram identificadas (Sabbagh et al., 2010). As SPIs mais estudadas e melhor caracterizadas são a SPI-1 e SPI-2, as quais codificam componentes dos Sistemas de Secreção Tipo III (T3SS - "*Type 3 Secretion System*") (Haneda et al., 2009, López et al., 2012). T3SS é um complexo multiproteico cuja função é permitir a translocação de proteínas efetoras do citoplasma bacteriano para o interior da célula hospedeira (Ashida et al., 2012). Sabe-se que os T3SS são importantes na colonização por *Salmonella* spp., mas a sequência de eventos e as funções de cada efector ainda estão sendo elucidadas (Knodler e Steele-Mortimer, 2003).

*Salmonella enterica* infecta o hospedeiro através da ingestão de água ou alimento contaminado. As bactérias que sobrevivem à acidez estomacal chegam ao lúmen intestinal, onde podem infectar células intestinais. No epitélio intestinal, os receptores das células hospedeiras interagem com fatores de adesão do patógeno, incluindo lipopolissacarídeos (LPS) e fímbrias. Após a adesão, é iniciada a invasão das células, que ocorre através de um mecanismo codificado e regulado por genes da SPI-1, no qual efetores bacterianos causam um rearranjo no citoesqueleto da célula hospedeira, levando à internalização do patógeno. Dentro da célula epitelial,



a bactéria permanece no interior de um compartimento fagossomal (SCV - "*Salmonella-containing vacuole*") (Ibarra e Steele-Mortimer, 2009). Entre os fatores da SPI-1 utilizados na invasão da célula epitelial estão componentes do T3SS, incluindo as proteínas Inv (Kaur e Jain, 2012).

Após *Salmonella* spp. estar no interior do SCV, esses vacúolos passam por um processo de maturação e migram no citoplasma da célula hospedeira até uma região perinuclear próxima ao complexo golgiense. Essa localização permite a captura de nutrientes através de vesículas de transporte endocíticas e exocíticas, em uma via que envolve efetores da SPI-2, como o SifA, além de fatores da SPI-3. A replicação bacteriana é então iniciada, tendo a presença dos filamentos induzidos por *Salmonella* (SIFs - "*Salmonella-induced filaments*"), que são extensões tubulovesiculares resultantes da fusão do SCV com endossomos/lisossomos tardios (López et al., 2012) (Figura 1). A função dos SIFs ainda não foi totalmente esclarecida, mas estudos indicam que estejam relacionados à maturação e estabilidade dos SCVs, e tenham importância na virulência de *Salmonella* spp. e sua replicação intracelular (Knodler e Steele-Mortimer, 2003, Schroeder et al., 2011).

A epidemiologia das infecções por *Salmonella* spp. variam com o tipo de *Salmonella* spp. envolvido. A febre entérica, causada por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi, é exclusiva de humanos e atinge principalmente as populações de países em desenvolvimento. Em áreas endêmicas, a febre entérica é mais frequente em crianças (Sánchez-Vargas et al., 2011).

A infecção por *Salmonella* spp. não tifóide está relacionada a diferentes síndromes clínicas, incluindo gastroenterites, bacteremia, infecção endovascular e infecção focal. Estima-se que 93,8 milhões de casos de gastroenterite causada por *Salmonella* spp. ocorram anualmente em todo o mundo, resultando em cerca de 155 mil óbitos. Desses casos, 80,3 milhões estariam ligados à ingestão de alimentos contaminados (Majowicz et al., 2010).

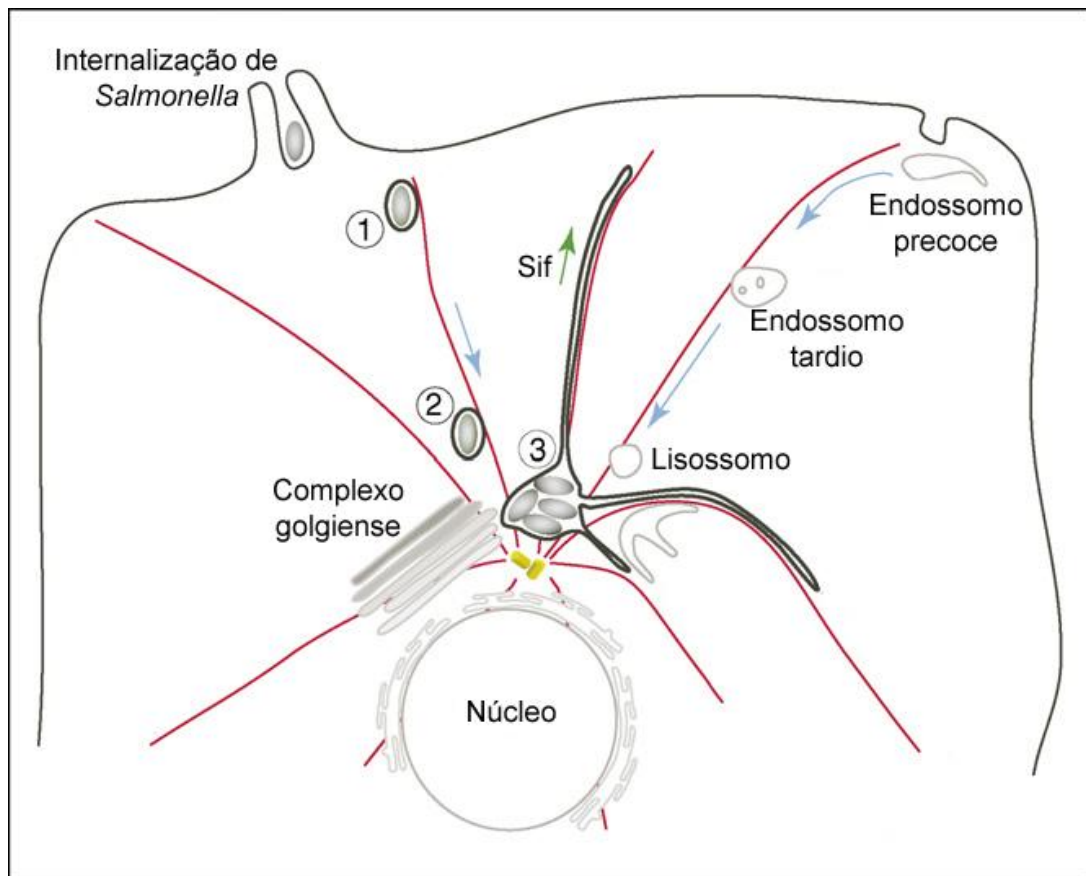


Figura 1. Esquema da biogênese dos vacúolos contendo *Salmonella* (SCV). *Salmonella* causa rearranjo do citoesqueleto da célula e é internalizada no SCV precoce (1). SCV migra para perto do complexo golgiense e núcleo (2). Ocorre fusão do SCV com endossomos/lisossomos tardios, formação do SIF e início da replicação bacteriana (3) (Adaptado de Steele-Mortimer, 2008).

## 2. Importância de *Salmonella* spp. em alimentos

*Salmonella* spp. estão disseminadas na natureza, sendo comumente encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, aves e répteis. Animais de criação são reservatórios importantes em países industrializados, e a ingestão de produtos de origem animal contaminados é considerada a principal rota de infecção aos humanos (Sánchez-Vargas et al., 2011). Carne bovina, de aves e ovos são veículos comumente envolvidos nos casos de salmonelose. Contudo, diversos outros alimentos também podem ser fonte de contaminação por *Salmonella* spp., como leite e seus derivados, frutas, vegetais e pescados (Carrasco et al., 2012, Jay et al., 2005). Para o surgimento do quadro de salmonelose, geralmente é necessária a ingestão de  $10^7$ - $10^9$  células de *Salmonella* spp. por grama, mas doses infectantes mais baixas também podem causar a doença, com variações entre os sorovares e o potencial patogênico da cepa envolvida (D'Aoust e Pivnick, 1976, Jay et al., 2005).

A variação na incidência das toxinfecções alimentares entre países se dá principalmente devido às diferentes concentrações dos patógenos na carne, o consumo per capita de carne no país, e os hábitos de preparo e consumo da população (Rhoades et al., 2009). Scallan et al. (2011), em um estudo do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), estimam que a cada ano, nos Estados Unidos da América (EUA), ocorra mais de um milhão de casos de salmonelose, o que corresponde a 11% das doenças de origem alimentar. Nesse mesmo estudo, constatou-se que *Salmonella* sp. não tifóides são os principais agentes causadores de hospitalizações e óbitos

dentre os casos de toxinfecções alimentares nesse país. Jones et al. (2008) analisaram dados de salmoneloses não tifóides do período de 1996 a 2006, provenientes do sistema de vigilância FoodNet, e observaram que os sorovares mais prevalentes nos EUA foram *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Heidelberg* e *S. Javiana* que, juntos, correspondem a 61% dos isolados.

De acordo com relatório da *European Food Safety Authority* (EFSA, 2012), *Salmonella* spp. são os principais causadores de toxinfecções alimentares na União Européia (UE), sendo responsáveis por 30,5% dos surtos reportados em 2010. Nesse ano, foram confirmados cerca de cem mil casos humanos de infecção por *Salmonella* spp., e apesar dessa incidência, de forma geral, ter se reduzido desde 2006, em alguns Estados Membros, como Eslováquia e Polônia, houve aumento da incidência de 2009 para 2010. Na UE, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares mais frequentemente isolados nos casos de salmonelose humana. *S. Enteritidis* é associada principalmente à ingestão de ovos e aves contaminadas, enquanto *S. Typhimurium* também está relacionada ao consumo de carne suína e bovina (EFSA, 2012).

De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, *Salmonella* spp. é o micro-organismo mais associado a surtos de toxinfecções alimentares no Brasil, tendo sido identificado como agente etiológico em cerca de 1.660 surtos no período de 2000 a 2011 (Brasil, 2011). Esse número, entretanto, é inferior ao real, uma vez que o perfil epidemiológico das toxinfecções alimentares é pouco conhecido no Brasil. Dados sobre os agentes etiológicos mais prevalentes, alimentos mais

frequentemente envolvidos, população de maior risco e outros fatores relacionados só estão disponíveis em algumas regiões (Brasil, 2010).

Tavechio et al. (2002) sorotiparam cepas de *Salmonella* spp. isoladas no Estado de São Paulo, no anos 1996 a 2000, a partir de diferentes fontes. Foram identificados 123 sorovares diferentes, sendo *Salmonella* Enteritidis o mais prevalente em alimentos, seguido por *Salmonella* Hagar. A maior parte dos 170 surtos de salmonelose estudados foi causada pela ingestão de maionese caseira contaminada. Welker et al. (2010) isolaram *Salmonella* spp. em 35% das 223 amostras de alimentos pesquisadas em que foram detectados micro-organismos patogênicos. Essas amostras eram sobras dos alimentos consumidos por pessoas acometidas em surtos de toxinfecções alimentares nos anos de 2006 e 2007 no Rio Grande do Sul. Costalunga e Tondo (2002) avaliaram dados epidemiológicos de 116 surtos de salmonelose também no Rio Grande do Sul, ocorridos entre 1997 e 1999. Maionese caseira foi o alimento mais comumente relacionado aos surtos (42,45%), seguido por carne e derivados (16,55%). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Kottwitz et al. (2010), que analisaram 286 surtos causados por *Salmonella* spp. no Estado do Paraná no período de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2008. A ingestão de alimentos contaminados à base de ovos foi responsável por 45% dos surtos, enquanto a ingestão de carne e derivados correspondeu a 34,8%. O sorovar mais prevalente foi *S. Enteritidis*, isolado em 80,6% dos alimentos contaminados.

No Brasil, a frequência de *Salmonella* spp. varia bastante nos diferentes estudos em que produtos cárneos foram analisados. Alguns desses estudos estão sintetizados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de *Salmonella* spp. em produtos cárneos em diferentes regiões do Brasil

Produtos	Região	Frequência (%)	Referência
Suínos abatidos	Estado do Mato Grosso	16,6	Silva et al., 2009
	Estado do Rio Grande do Sul	55,7	Bessa et al., 2004
	Estado do Rio Grande do Sul	71,6	Schwarz et al., 2009
Cortes suínos	Estado do Rio Grande do Sul	49,6	Bandeira, 2003
	Pelotas - RS	80,0	Tessmann et al., 2008
Carcaças de frango	Estado de São Paulo	2,5	Tessari et al., 2008
	Viçosa - MG	3,3	Cossi et al., 2012
	Viçosa - MG	6,6	Matias et al., 2010
	Nordeste do Brasil	9,6	Duarte et al., 2009
	Estado de São Paulo	13,3	Carvalho e Cortez, 2005
	Estado de São Paulo	13,9	Ristori et al., 2008
	Estado de Goiás	19,8	Rezende et al., 2005
	Estado de São Paulo	20,7	Cardoso et al., 2005
	Campinas - SP	24,0	Vessoni, 2004
	Jaboticabal - SP	32,0	Santos et al., 2000
	Manaus - AM	50,0	Tirolli e Costa, 2006
	Botucatu - SP	60,0	Yamatogi et al., 2012
Cortes de frango	Pelotas - RS	10,5	Baú et al., 2001
	Estado de São Paulo	11,4	Cardoso et al., 2005
	Goiânia - GO	13,2	Nunes et al., 1995
	Estado de São Paulo	22,9	Carvalho e Cortez, 2005
	Sul do Brasil	39,3	Ribeiro et al., 2007
	Jaboticabal - SP	40,0	Carvalho e Cortez, 2003
Carcaças bovinas	Estado de São Paulo	3,0	Lopes, 2011
	Estado do Rio Grande do Sul	3,3	Silva, 2011
Cortes bovinos	Goiânia - GO	4,3	Prado et al., 1998
	Diamantina - MG	10,0	Almeida et al., 2010
Cortes ovinos	Recife - PE	29,2	Moura et al., 2007
	Recife - PE	30,8	Fernandes et al., 2009
Embutidos	Rio de Janeiro e Niterói - RJ	3,0	Martins et al., 2008
	Cuiabá - MT	3,3	Almeida Filho e Sigarini, 2002
	Jaboticabal - SP	7,5	Cortez et al., 2004

Continuação da Tabela 1.

Produtos	Região	Frequência (%)	Referência
Embutidos	Estado do Rio Grande do Sul	11,6	Dias et al., 2008
	Estado de São Paulo	16,0	Carvalho e Cortez, 2005
	Porto Alegre - RS	24,4	Mürmann et al., 2009
	Lages - SC	27,0	Spricigo et al., 2008
	Jaboticabal - SP	28,5	Carvalho e Cortez, 2003

### **3. Metodologias de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos**

#### *3.1. Metodologias convencionais*

A análise microbiológica de alimentos é fundamental na manutenção da segurança na cadeia de produção de alimentos. Tanto órgãos governamentais de controle quanto empresas privadas utilizam esses métodos analíticos no monitoramento e análise de riscos. Os métodos convencionais podem ser acessados por todos, uma vez que a composição dos meios de cultura está disponível, as técnicas usadas são descritas em detalhes suficientes para que sejam reproduzidas, e o material necessário pode ser adquirido em múltiplos fornecedores (Jasson et al., 2010).

Os métodos convencionais de detecção de *Salmonella* spp. consistem basicamente nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo e diferencial, testes bioquímicos e confirmação sorológica. Esses métodos geralmente demoram vários dias. A ISO 6579:2002, por exemplo, requer três dias de trabalho para resultados negativos e cinco dias para confirmação de resultados positivos (ISO, 2002). Outra limitação da metodologia convencional é a dificuldade em detectar células que não estejam cultiváveis. Quando as condições do meio não são favoráveis à sua sobrevivência, algumas bactérias têm a capacidade de entrar em um estado fisiológico de latência, no qual perdem a capacidade de serem cultivadas, apesar de permanecerem viáveis (Viáveis Não Cultiváveis - VNC) (Oliver, 2005). Alguns fatores presentes nos alimentos, como concentração altas de sais, temperatura ou pH baixos, escassez de



nutrientes e presença de antimicrobianos, podem desencadear o estado VNC (Gupte et al., 2003, Rowan, 2004) . As bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp., mesmo nesse estado, podem manter seus fatores de virulência, e apesar de não serem detectadas pelos métodos convencionais de cultivo microbiológico, representam um risco potencial à saúde dos consumidores (Panutdaporn et al., 2006).

O objetivo do pré-enriquecimento é a máxima recuperação das células bacterianas estressadas e, nessa etapa, são utilizados caldos de enriquecimento não seletivos. A Água Peptonada Tamponada é um meio frequentemente empregado nos protocolos padrões de detecção de *Salmonella* spp., incluindo a ISO 6579:2002, mas diversos outros estão disponíveis, como Caldo Lactosado, Caldo de Pré-enriquecimento Universal e Caldo Nutriente (FDA, 2007, ISO, 2002, Taskila et al., 2012). No Brasil, os protocolos oficiais de análises microbiológicas de produtos de origem animal estão dispostos na Instrução Normativa nº 62, que indica a utilização de Solução Salina Peptonada Tamponada, com exceção da análise de produtos gordurosos, na qual deve ser adicionado o surfactante Tween 80, e nas análises de leite em pó e soro de leite em pó, no qual deve ser utilizada água destilada e solução aquosa de verde brilhante (Brasil, 2003).

A etapa subsequente é o enriquecimento seletivo, que se baseia na utilização de meios que contenham substâncias que inibam a multiplicação de micro-organismos interferentes, principalmente outras enterobactérias e bactérias Gram positivas (Busse, 1995). Os meios mais utilizados são Caldo Soja Rappaport-Vassiliadis, Caldo Selenito Cistina, Caldo Tetracionato, Caldo Tetracionato Verde Brilhante e Caldo Müller-Kauffmann Tetracionato

Novobiocina. Alguns dos agentes seletivos presentes nesses meios são sais biliares, ácido nalidíxico, verde brilhante, novobiocina, selenito de sódio e tetrionato (Taskila et al., 2012). A temperatura de incubação mais elevada também é um fator seletivo utilizado em diversos meios no isolamento de *Salmonella* spp. (Harvey e Price, 1968, Harvey e Price, 1979, Kafel e Bryan, 1977, Ware, 1954). O Bacteriological Analytical Manual (BAM) preconiza a incubação do Caldo Tetrionato a 43 °C para alimentos com alta carga microbiana e 35 °C para baixa carga (FDA, 2007). Já o caldo Rappaport-Vassiliadis é geralmente incubado a temperaturas próximas a 42 °C, temperatura na qual sua seletividade é maior (Busse, 1995, FDA, 2007, ISO, 2002).

Os protocolos oficiais indicam que pelo menos dois meios de cultura seletivos sejam utilizados na etapa de enriquecimento seletivo, visando à recuperação de cepas de *Salmonella* spp. com diferentes exigências para multiplicação (Brasil, 2003, Busse, 1995, FDA, 2007, ISO, 2002).

Dentre os meios sólidos clássicos para isolamento de *Salmonella* spp. estão o Ágar Salmonella-Shigella (SS), Ágar Entérico de Hektoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e ágar Verde Brilhante (Busse, 1995, King e Metzger, 1968, Leifson, 1935, Rakieten e Rettger, 1927, Taylor, 1965, Wilson e Blair, 1927). Os meios clássicos podem gerar falsos positivos, com o desenvolvimento de colônias de *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp., que podem obliterar o crescimento de colônias de *Salmonella* spp. (Manafi, 2000). Com o intuito de aumentar a especificidade, foram desenvolvidos vários outros meios, como o Ágar SM-ID (bioMérieux, França), Ágar Rambach (Merck, Alemanha), MUCAP-test

(Biolife, Itália), CHROMagar *Salmonella* (CHROMagar, França), Ágar Rainbow *Salmonella* (Biolog, EUA), Ágar Cromogênico *Salmonella* Esterase (PPR Diagnostics Ltd, Reino Unido), Ágar Compass *Salmonella* (Biokar Diagnostics, França), Meio Cromogênico ABC (Lab M. Ltd., Reino Unido), Meio XA, Ágar NBGL e Ágar XLT4 (Cooke et al., 1999, Dusch e Altwegg, 1995, Gaillot et al., 1999, Miller et al., 1991, Olsson et al., 1991, Park et al., 2012, Perry et al., 1999, Poisson, 1992, Poupart et al., 1991, Rambach, 1990).

A não fermentação de lactose, produção de H<sub>2</sub>S e motilidade são características de *Salmonella* spp. usadas em vários meios de isolamento, mas a existência de cepas que não possuem esse perfil bioquímico demanda a utilização de pelo menos dois meios de cultura baseados na expressão de fenótipos diferentes na etapa de plaqueamento seletivo. Também deve ser destacado que nem todos os meios são efetivos no isolamento de *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi* (de Boer, 1998).

Após o plaqueamento e isolamento de colônias típicas de *Salmonella* spp., são feitos testes bioquímicos confirmatórios baseados na evidência de propriedades fisiológicas e metabólicas dos isolados suspeitos (Brasil, 2003, ISO, 2002). O ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) é utilizado na verificação de fermentação de glicose, sacarose e lactose e produção de H<sub>2</sub>S. No Ágar Lisina Ferro (LIA) é possível observar a descarboxilação da L-Lisina e a produção de H<sub>2</sub>S. Outras características comumente pesquisadas são a produção de indol, H<sub>2</sub>S, urease, e a presença de citocromo oxidase, pirrolidonil peptidase (PYRase), β-galactosidase e motilidade.

Além dos testes bioquímicos, também são feitos testes de soroaglutinação, que se baseiam na visualização de aglutinação na reação antígeno-anticorpo (Brasil, 2003). São utilizados antissoros polivalentes somáticos (O) e flagelares (H) (Downes e Ito, 2001). É preciso assegurar-se de que os antissoros utilizados são adequados para detecção de todos os sorovares de *Salmonella* (ISO, 2002).

### 3.2. Metodologias alternativas

As metodologias alternativas de detecção são desenvolvidas com o intuito de reduzir o tempo de análise, obter resultados mais sensíveis e específicos, melhorar o fluxo de manipulação de amostras e possibilitar a automação dos laboratórios (Jasson et al., 2010, Mandal et al., 2011). Dentre essas metodologias se destacam as técnicas baseadas em ácidos nucleicos (Cheung e Kam, 2012, Harris e Griffiths, 1992).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi idealizada por Ghobind Khorana e sua equipe no início da década de 70, mas não era prática devido às limitações da época (Kleppe et al., 1971). Somente em 1983 a técnica foi totalmente desenvolvida, por Kary Mullis e sua equipe da Cetus Corporations, sendo aprimorada e popularizada desde então (Harris e Griffiths, 1992, Mullis et al., 1986, Saiki et al., 1988, Sambrook e Russell, 2001). O procedimento de PCR consiste basicamente em três etapas. Primeiramente, ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA a altas temperaturas. Depois, dois oligonucleotídeos iniciadores (chamados *primers* em inglês) se anelam às fitas moldes de DNA. Os *primers* são

complementares às sequências que flanqueiam a região a ser amplificada e não são complementares entre si. Uma DNA polimerase termostável, como a Taq Polimerase, atua na extensão das fitas de DNA, adicionando novos nucleotídeos. O processo se repete a cada ciclo e o número de cópias do DNA alvo cresce exponencialmente.

Na área de microbiologia de alimentos, a PCR é usada principalmente na detecção de micro-organismos patogênicos (Harris e Griffiths, 1992). Desde a criação dessa técnica, dezenas de protocolos foram propostos para a detecção de *Salmonella* spp.. Dentre os primeiros desenvolvidos, estão os trabalhos de Rahn et al. (1992), Aabo et al. (1993), e Jones et al. (1993).

Rahn et al. (1992) desenvolveram um protocolo de detecção de *Salmonella* spp. baseado na amplificação de uma região do gene *invA*, que está envolvido na transcrição de proteínas relacionadas à invasão celular, utilizando o par de *primers* 139/141. Nesse estudo, foram testados 630 isolados de *Salmonella* spp. (mais de cem sorovares diferentes) e 142 isolados de outras bactérias como controles negativos (21 gêneros). O fragmento esperado de 284 pb não foi amplificado em duas cepas de *Salmonella* Litchfield e duas de *S. Senftenberg*, e alguns isolados de não-*Salmonella* apresentaram produtos de amplificação de outros tamanhos (bandas inespecíficas).

Aabo et al. (1993) desenharam oito oligonucleotídeos a partir de um fragmento cromossomal de *Salmonella* spp. Após testes de hibridização, o par de *primers* ST11/ST15 foi selecionado como o mais eficiente. Foram testadas 146 cepas de *Salmonella* sp. (118 sorovares) e 86 cepas de outras bactérias (21 gêneros). O produto específico de PCR formado foi de 429 pb.

Jones et al. (1993) testaram um protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em ostras, e utilizaram como alvo da amplificação uma região do gene *hns*, que codifica uma proteína de ligação ao DNA. Os primers testados, LHNS-531 e RHNS-682, resultavam em um produto de 152 pb. O DNA foi extraído de tecidos de ostras naturalmente contaminadas, e não foram utilizadas etapas de enriquecimento. Sanath Kumar et al. (2003) utilizaram estes mesmos *primers* na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de peixe, camarão e amêijoas. A detecção de *Salmonella* spp. por PCR se mostrou mais eficiente que a metodologia convencional, visto que esta resultou em dois falsos negativos. A eficiência dos *primers* LHNS-531 e RHNS-682 foi corroborada no estudo de Shabarinath et al. (2007), que compararam seu desempenho na detecção de *Salmonella* spp. em frutos do mar com o par de *primers* desenhados por Rahn et al. (1992) e o descrito por Stone et al. (1994), que amplifica uma região do locus *inv*.

Kwang et al. (1996) desenvolveram um protocolo de PCR que teve como alvo o gene *ompC*, que codifica proteínas estruturais de membrana externa em *Salmonella* spp. e outras bactérias Gram negativas. Foram desenhados, inicialmente, três pares de pares de *primer*, mas o par S18/S19 se mostrou o mais eficiente, amplificando todos os 60 isolados de *Salmonella* spp. (40 sorovares), e não amplificando os 42 isolados de outras bactérias (24 espécies).

Malorny et al. (2003) avaliaram quatro pares de *primers* na detecção de *Salmonella* spp., incluindo 139/141 (Rahn et al., 1992), ST11-ST15 (Aabo et al., 1993), e S18/S19 (Kwang et al., 1996). Além destes, também utilizou os *primers* P1/P2, que têm como alvo a região *oriC*, que é a origem de

replicação cromossomal (Widjoatmodjo et al., 1991). O par de *primers* que apresentou maior sensibilidade e especificidade foi o 139/141, que tem como alvo o gene *invA*. As condições de PCR desse par de *primers* selecionado foram otimizadas e a utilização de um Controle Interno de Amplificação (IAC - "*Internal Amplification Control*") foi incluída.

O IAC é uma sequência de DNA presente em cada reação de PCR, que é coamplificado simultaneamente à sequência alvo. Em uma reação de PCR sem IAC, a ausência de banda pode significar um resultado verdadeiramente negativo, no qual a região alvo não está presente. Contudo, também pode ser derivada de uma inibição decorrente de falhas no termociclador, reagentes adicionados incorretamente, atividade inadequada da DNA polimerase, ou presença de substâncias inibitórias da matriz analisada. Já em uma PCR com IAC, se não houver algum tipo de inibição, o controle interno será amplificado mesmo se a região alvo não estiver presente na reação (Hoorfar et al., 2003).

Alvarez et al. (2004) também utilizaram um IAC ao desenvolverem um protocolo multiplex para detecção de *Salmonella* spp. em amostras clínicas. O PCR multiplex consiste na utilização de mais de um par de *primers* na mesma reação, resultando em produtos de amplificação de diferentes tamanhos. Para detecção do gênero *Salmonella*, foram desenhados os *primers* OMPCF e OMPCR, a partir do gene *ompC*, cuja amplificação resulta em um produto de 204 pb. Também foram utilizados na reação multiplex *primers* específicos para *S. Enteritidis* (304 pb), *S. Typhimurium* (401 pb), *S. Typhimurium* sorotipos DT104 e U302 (102 pb), *Salmonella* sorogrupo C2 (502 pb) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. 4,5,12:i:- (705 pb). A

técnica teve sensibilidade de 93%, especificidade de 100% e eficiência de 98%.

O método convencional de PCR, apesar de mais rápido do que a metodologia microbiológica tradicional, ainda demanda espaço e trabalho pós-amplificação, com a eletroforese em gel e análise. Para reduzir os recursos laboratoriais demandados e diminuir a possibilidade de contaminação, ensaios fluorogênicos de PCR foram desenvolvidos (Cheung e Kam, 2012). Um exemplo é o sistema automatizado BAX PCR (Dupont Qualicon, EUA), no qual as culturas são adicionadas a tubos contendo os reagentes de PCR liofilizados, incluindo DNA Polimerase, desoxirribonucleotídeos, *primers*, controle interno positivo e o corante fluorescente SybrGreen. Após a amplificação, o sistema automatizado começa a fase de detecção, no qual o sinal fluorescente é mensurado, e uma curva é gerada e interpretada pelo software. O produto de amplificação de cada micro-organismo alvo, como *Salmonella* spp., tem um perfil específico, permitindo sua detecção (Bailey e Cosby, 2003). Esse sistema apresenta resultados similares aos obtidos pela metodologia oficial de detecção de *Salmonella* spp. preconizada no Brasil pela Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2003, Tomazelli et al., 2008).

Com o desenvolvimento dos ensaios fluorogênicos automatizados de PCR, tornou-se possível o monitoramento em tempo real das amplificações, levando à quantificação da concentração de DNA inicialmente presente na amostra. O PCR em tempo real pode ser utilizado para diversos fins, inclusive a detecção e quantificação de patógenos em alimentos (Postollec et al., 2011). Diversos protocolos de PCR em tempo real foram



desenvolvidos com esse objetivo, e entre os principais genes utilizados como alvo de amplificação desses ensaios estão *invA*, *sipC*, *spaO*, *fimC* e *himA* (Malorny et al., 2009). Entre as plataformas e kits comerciais de tempo real usados na detecção e quantificação de *Salmonella* spp. em alimentos estão "Taqman *Salmonella enterica* Detection Kit" (Applied Biosystems, EUA), "iQ-Check *Salmonella* II Kit" (BioRad, EUA) e "LightCycler *Salmonella* Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha) (Cheung e Kam, 2012).

Existem outros métodos de amplificação de ácidos nucleicos além da PCR, como os mecanismos isotérmicos NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), que amplifica sequências de RNA, e LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), que amplifica DNA (Compton, 1991, Notomi et al., 2000). Essas técnicas dispensam a utilização de termocicladores e podem ser utilizadas na detecção de *Salmonella* spp. em alimentos (Cook, 2003, Li et al., 2009, Wang et al., 2008, Ye et al., 2011).

Outras técnicas bastante utilizadas na detecção de *Salmonella* spp. são as baseadas em imunoensaios, como "VIDAS *Salmonella* Assay" (bioMérieux, França), "Tecra Unique<sup>TM</sup> *Salmonella* Test" (Tecra, Austrália), e "1-2 Test for *Salmonella*" (Biocontrol Systems, EUA) (FDA, 2007, Keith, 1997).

## REFERÊNCIAS

Aabo, S., Rasmussen, O.F., Roseen, L., Sørensen, P.D., Olsen, J.E., 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 7, 171-178.

Agbaje, M., Begum, R.H., Oyekunle, M.A., Ojo, O.E., Adenubi, O.T., 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. Folia Microbiol. 56, 497-503.

Almeida Filho, E.S., Sigarini, C.O., 2002. Características microbiológicas de lingüiça frescal, produzida sob inspeção federal e sob condições artesanais, comercializada no município de Cuiabá-MT. Hig. Aliment. 16, 102-106.

Almeida, A.C., Souza, R.M., Pinho, L., Sobrinho, E.M., Silva, B.C.M., 2010. Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. Acta Vet. Bras. 4, 278-285.

Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42, 1734-1738.

Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., Sasakawa, C., 2012. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. Nat. Chem. Biol. 8, 36-45.

Bailey, J.S., Cosby, D.E., 2003. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the Automated BAX PCR System. J. Food Prot. 66, 2138-2140.

Bandeira, R.M., 2003. Isolamento e caracterização de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Baú, A.C., Carvalho, J.B., Aleixo, J.A.G., 2001. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. Cienc. Rural. 31, 303-307.

Becker, A.K., Kiel, G., 2011. Análise microbiológica de carne bovina in natura comercializada em supermercados de Cascavel – PR. Thêma Sci. 1, 149-155.

Bessa, M.C., Costa, M., Cardoso, M., 2004. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do sul. Pesq. Vet. Bras. 24, 80-84.

Brasil, 2003. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de Agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União de 18/09/2003, 1, 14-51.

Brasil, 2010. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde.

Brasil, 2011. Dados Epidemiológicos - DTA Período de 2000 a 2011\*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Portal da Saúde - Doenças Transmitidas por Alimentos. Acessado em 04 de Agosto de 2012. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550)>

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38, 2465-2467.

Busse, M., 1995. Media for *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 26, 117-131.

Cardoso, A.L.S.P., Castro, A.G.M., Tessari, E.N.C., Baldassi, L.P., Eliana Scarcelli., 2005. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango Hig. Aliment. 19, 144-150.

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R.M., 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Food Res. Int. 45, 545-556.

Carvalho, A.C.F.B., Cortez, A.L.L., 2005. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. Cienc. Rural. 35, 1465-1468.

Carvalho, A.C.F.B., Cortez, A.L.L., 2003. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. Ars Vet. 19, 57-62.

Cheung, P.-Y., Kam, K.M., 2012. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. *Food Res. Int.* 45, 802-808.

Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 350, 91-92.

Cook, N., 2003. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Methods.* 53, 165-174.

Cooke, V.M., Miles, R.J., Price, R.G., Richardson, A.C., 1999. A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 807-812.

Cortez, A.L.L., Carvalho, A.C.F.B., Amaral, L.A., Salotti, B.M., Vidal-Martins, A.M.C., 2004. Coliformes fecais, estafilococos coagulase positiva (ECP), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em lingüiça frescal. *Alim. Nutr.* 15, 215-220.

Cossi, M.V.C., Almeida, M.V., Dias, M.R., Pinto, P.S.A., Nero, L.A., 2012. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. *Cienc. Rural.* 42, 1675-1681.

Costalunga, S., Tondo, E.C., 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Braz. J. Microbiol.* 33, 342-346.

D'Aoust, J.Y., Pivnick, H., 1976. Small infectious doses of *Salmonella*. *The Lancet.* 307, 866.

de Boer, E., 1998. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 43-53.

Dias, P.A., Conceição, R.C.S., Coelho, F.J.O., Tejada, T.S., Segatoo, M., Timm, C.D., 2008. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 75, 359-363.

Downes, F.P., Ito, K., 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4<sup>a</sup> ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

Duarte, D.A.M., Ribeiro, A.R., Vasconcelos, A.M.M., Santos, S.B., Silva, J.V.D., Andrade, P.L.A., Falcão, L.S.P.C.A., 2009. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz. J. Microbiol.* 40, 569-573.

Dusch, H., Altwegg, M., 1995. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 802-804.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal.* 10, pp. 442.

Fernandes, E.F.T.S., Paulino, A.A., Fernandes, M.F.T.S., Moura, A.P.B.L., Mota, R.A., 2009. Qualidade microbiológica da carne de ovinos (*Ovis aries*) comercializada nos mercados públicos do Recife-PE. *Med. Vet. (Recife).* 3, 7-12.

Food and Drug Administration (FDA), 2007. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella* (Ed. Dezembro de 2007).

Gaillot, O., di Camillo, P., Berche, P., Courcol, R., Savage, C., 1999. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen Enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples. J. Clin. Microbiol. 37, 762-765.

Grimont, P.A., Weill, F.-X., 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Samonella*, Institut Pasteur, Paris.

Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., Weill, F.X., 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 161, 26-29.

Gupte, A.R., De Rezende, C.L., Joseph, S.W., 2003. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6669-6675.

Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., Thoen, C.O., 2011. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (4<sup>a</sup> ed.). Ames, IA: Wiley-Blackwell.

Haneda, T., Ishii, Y., Danbara, H., Okada, N., 2009. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. FEMS Microbiol. Lett. 297, 241-249.

Harris, L.J., Griffiths, M.W., 1992. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). Food Res. Int. 25, 457-469.

Harvey, R.W., Price, T.H., 1968. Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of salmonellas from heavily contaminated materials. J. Hyg. (Lond.). 66, 377-381.

Harvey, R.W.S., Price, T.H., 1979. Principles of *Salmonella* Isolation. J. Appl. Microbiol. 46, 27-56.

Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. J. Clin. Microbiol. 41, 5835.

Ibarra, J.A., Steele-Mortimer, O., 2009. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cell. Microbiol. 11, 1579-1586.

International Organization for Standardization (ISO), 2002. ISO 6579:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiol. 27, 710-730.

Jay, J.M., Loessner, M.J. , Golden, D.A., 2005. Modern Food Microbiology (7<sup>a</sup> ed.). Nova York, NY: Springer.

Jones, D.D., Law, R., Bej, A.K., 1993. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using Polymerase Chain Reactions (PCR) and gene probes. J. Food Sci. 58, 1191-1197.



- Jones, T.F., Ingram, L.A., Cieslak, P.R., Vugia, D.J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., Angulo, F.J., 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J. Infect. Dis.* 198, 109-114.
- Kafel, S., Bryan, F.L., 1977. Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating salmonellae from ground-meat filtrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 285-291.
- Kaur, J., Jain, S.K., 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol. Res.* 167, 199-210.
- Keith, M., 1997. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. *J. Food Prot.* 60, 682-685.
- King, S., Metzger, W.I., 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen Enteric Agar. *Appl. Microbiol.* 16, 577-578.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G., 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56, 341-361.
- Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., 2003. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic.* 4, 587-599.
- Kottwitz, L.B.M., Oliveira, T.C.R.M., Alcocer, I., Farah, S., Abrahão, W.M., Rodrigues, D.P., 2010. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose

ocorridos no periodo de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. Acta. Sci. Health. Sci. 32, 9-15.

Kumar, R., Surendran, P.K., Thampuran, N., 2009. Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. Food Control. 20, 376-380.

Kwang, J., Littledike, E.T., Keen, J.E., 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. Lett. Appl. Microbiol. 22, 46-51.

Leifson, E., 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. J. Pathol. Bacteriol. 40, 581-599.

Li, X., Zhang, S., Zhang, H., Zhang, L., Tao, H., Yu, J., Zheng, W., Liu, C., Lü, D., Xiang, R., Liu, Y., 2009. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. Int. J. Food Microbiol. 133, 252-258.

Lopes, J.T., 2011. *Salmonella* spp. na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição por PFGE. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

López, F.E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., Delgado, M.A., 2012. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? Food Res. Int. 45, 842-851.

- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50, 882-889.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R., 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 290-296.
- Malorny, B., Huehn, S., Dieckmann, R., Krämer, N., Helmuth, R., 2009. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. *Food Analytical Methods.* 2, 81-95.
- Manafi, M., 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 205-218.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.* 6, 87-102.
- Martins, L.L., Santos, I.F., Franco, R.M., Oliveira, L.A.T., Bezz, J., 2008. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo "hot dog" comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 67, 215-220.
- Matias, B.G., Pinto, P.S.A., Cossi, M.V.C., Nero, L.A., 2010. *Salmonella* spp. and hygiene indicator microorganisms in chicken carcasses obtained at different processing stages in two slaughterhouses. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 313-318.

Miller, R.G., Tate, C.R., Mallinson, E.T., Scherrer, J.A., 1991. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. Poul. Sci. 70, 2429-2432.

Moura, A.P.B.L., Pinheiro Júnior, J.W., Oliveira, R.B.A., Duarte, D.A.M., Ribeiro, A.R., Reis, E.M.F., 2007. Pesquisa de coliformes termotolerantes, totais e *Salmonella* spp. em carnes caprinas comercializadas na Cidade do Recife, Pernambuco. Arq. Inst. Biol. 74, 293-299.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1, 263-273.

Mürmann, L., Santos, M.C., Cardoso, M., 2009. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. Food Control. 20, 191-195.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28, e63.

Nunes, I.A., Mesquita, A.J., Andrade, M.A., Oliveira, A.N., 1995. Ocorrência de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos comercializados em Goiânia-GO. Pesq. Agropec. Trop. 25, 1-5.

Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. 43, 93-100.

Olsson, M., Syk, A., Wollin, R., 1991. Identification of salmonellae with the 4-methylumbelliferyl caprilate fluorescence test. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2631-2632.

Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Asakura, H., Makino, S.I., 2006. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 241-247.

Park, S.H., Ryu, S., Kang, D.H., 2012. Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3222-3226.

Perry, J.D., Ford, M., Taylor, J., Jones, A.L., Freeman, R., Gould, F.K., 1999. ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 37, 766-768.

Poisson, D.M., 1992. Novobiocin, brilliant green, glycerol, lactose agar: a new medium for the isolation of *Salmonella* strains. *Res. Microbiol.* 143, 211-216.

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848-861.

Poupart, M.C., Mounier, M., Denis, E., Sirot, J., Couturier, C., Villeval, E., 1991. A new chromogenic ready-to-use medium for *Salmonella* detection,

Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Oslo, Noruega.

Prado, C.S., Lage, M.E., Mesquita, A.J., Palma, C.S.C., Nunes, I.A., Oliveira, J.P., 1998. Qualidade microbiológica da carne homogeneizada comercializada em um hipermercado em Goiânia (GO). Anais Esc. Agron. e Vet. 28, 17-27.

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C., Curtiss Iii, R., Gyles, C.L., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes. 6, 271-279.

Rakieten, M.L., Rettger, L.F., 1927. Brilliant Green and its use in an enrichment medium in the isolation of typhoid and paratyphoid organisms. J. Infect. Dis. 41, 93-110.

Rambach, A., 1990. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 301-303.

Rezende, C.S.M., Mesquita, A.J., Andrade, M.A., Linhares, G.F.C.L., Mesquita, A.Q., Minafra, C.S., 2005. Serovars of *Salmonella* isolated from carcasses of broilers slaughtered in the State of Goiás, Brazil, and their resistance profiles to antibiotics. Rev. Port. Cienc. Vet. 100, 199-203.

Rhoades, J.R., Duffy, G., Koutsoumanis, K., 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and

*Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. Food Microbiol. 26, 357-376.

Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R., Bessa, M.C., Nascimento, V.P., 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. Braz. J. Microbiol. 38, 296-299.

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., 2008. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. Bol. Epidemiol. Paul. 5, 16-19.

Rowan, N.J., 2004. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? Trends Food Sci. Technol. 15, 462-467.

Sabbagh, S.C., Forest, C.G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., Daigle, F., 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol. Lett. 305, 1-13.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science (New York, N.Y.). 239, 487-491.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed.). Nova York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanath Kumar, H., Sunil, R., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2003. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 91-95.

Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A., Gómez-Duarte, O.G., 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* 9, 263-277.

Santos, D.M.S., Berchieri Júnior, A., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Amaral, L.A., 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq. Vet. Bras.* 20, 39-42.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerging Infect. Dis.* 17, 7-15.

Schroeder, N., Mota, L.J., Méresse, S., 2011. *Salmonella*-induced tubular networks. *Trends Microbiol.* 19, 268-277.

Schwarz, P., Calveira, J., Sella, A., Bessa, M., Barcellos, D.E.S.N., Cardoso, M., 2009. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61, 1028-1034.

Shabarinath, S., Sanath Kumar, H., Khushiramani, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2007. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 227-233.



Silva, F.F.P., 2011. Investigação de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Silva, M.C., Faria, G.S., Paula, D.A.J., Martins, R.P., Junior, J.G.C., Kich, J.D., Colodel, E.M., Nakazato, L., Dutra, V., 2009. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. Cienc. Rural. 39, 266-268.

Spricigo, D.A., Matsumoto, S.R., Espíndola, M.L., Ferraz, S.M., 2008. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. Ciênc. Tecnol. Aliment. 28, 779-785.

Steele-Mortimer, O., 2008. The *Salmonella*-containing vacuole - Moving with the times. Curr. Opin. Microbiol. 11, 38-45.

Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., McVey, S., Chengappa, M.M., 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. J. Clin. Microbiol. 32, 1742-1749.

Taskila, S., Tuomola, M., Ojamo, H., 2012. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. Food Control. 26, 369-377.

Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C.R., Peresi, J.T.M., Fuzihara, T.O., Yonamine, E.K., Jakabi, M., Fernandes, S.A., 2002. *Salmonella* serotypes isolated from

nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. J. Food Prot. 65, 1041-1044.

Taylor, W.I., 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars: new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 44, 471-475.

Tessari, E.N.C., Cardoso, A.L.S.P., Kanashiro, A.M.I., Stoppa, G.F.Z., Luciano, R.L., Castro, A.G.M., 2008. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. Cienc. Rural. 38, 2557-2560.

Tessmann, C., Zocche, F., Lima, A.S., Bassani, M., Lopes, G.V., Silva, W.P., 2008. Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas (RS). B.CEPPA. 26, 307-313.

Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 521-524.

Tirolli, I.C.C., Costa, C.A., 2006. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. Acta Amazon. 36, 205-208.

Tomazelli, I.B., de Freitas, J.B., Fabbi, L.M., Filipini, T.A., Silva, C.M., Bedin, J.M., Duarte, D.A., dos Santos, A., Baccarin, A., Higa, L.R., Yano, D.M., Killner, M., Frezza, A.L., Abecia, E.C., Tronco, V.M., Tomazelli Junior, O., Barioni Junior, W., 2008. Comparison of the BAX system PCR method to

Brazil's official method for the detection of *Salmonella* in food, water, and environmental samples. J. Food Prot. 71, 2442-2447.

Vessoni, C.L.Z., 2004. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isolados da carcaças de frango. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., Geng, Y., Li, L., 2008. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. Food Res. Int. 41, 69-74.

Ware, G.C., 1954. The effect of incubation temperature on the growth requirements of *Proteus vulgaris* and *Salmonella typhi*. J. Gen. Microbiol. 11, 398-400.

Welker, C.A.D., Both, J.M.C., Longaray, S.M., Haas, S., Soeiro, M.L.T., Ramos, R.C., 2010. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. R. Bras. Bioci. 8, 44-48.

Widjojatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Torensma, R., Keller, B.H.I., Verhoef, J., 1991. Evaluation of the Magnetic Immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 935-938.

Wilson, W.J., Blair, E.M., 1927. Use of a Glucose Bismuth Sulphite Iron Medium for the isolation of *B. typhosus* and *B. proteus*. J. Hyg. (Lond.). 26, 374-391.

Yamatogi, R.S., Padovani, C.R., Galvão, J.A., Bersot, L.S., Pinto, J.P.A.N., 2012. *Salmonella* spp. in poultry carcass: evaluation of sample preparation methods and effect of storage under refrigeration on pathogen recovery. *Microbiol. Res. (Pavia)*. 3, 50-53.

Ye, Y., Wang, B., Huang, F., Song, Y., Yan, H., Alam, M.J., Yamasaki, S., Shi, L., 2011. Application of in situ loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods. *Food Control*. 22, 438-444.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar e comparar seis protocolos de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. e testar o mais eficiente em ensaio com carne bovina artificialmente contaminada.

### Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar um gene específico de *Salmonella* spp. e a partir dele desenhar um par de oligonucleotídeos iniciadores a ser usado na detecção desse patógeno por PCR;
- ✓ Avaliar seis pares de oligonucleotídeos iniciadores, incluindo o desenhado neste trabalho, quanto à eficiência na detecção de *Salmonella* spp., utilizando cepas de referência, isolados de campo identificados previamente como *Salmonella* spp., e isolados obtidos de amostras de carne bovina naturalmente contaminadas;
- ✓ Selecionar o par de oligonucleotídeos iniciadores que apresentou o melhor desempenho e avaliá-lo na detecção de *Salmonella* spp. artificialmente inoculada em sistemas cárneos, em diferentes etapas de enriquecimento.

**ARTIGO: Avaliação de sequências alvo e PCR em diferentes etapas da metodologia convencional para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina artificialmente contaminada**

## RESUMO

*Salmonella* spp. estão entre os principais causadores de toxinfecções alimentares em todo o mundo, sendo essencial o desenvolvimento e avaliação de metodologias sensíveis, específicas e rápidas de detecção desse patógeno, como a PCR. Neste trabalho, seis pares de oligonucleotídeos iniciadores foram avaliados na detecção de *Salmonella* por PCR, sendo testados com diversos isolados de *Salmonella* spp. e outros micro-organismos. O par SIFBF/SIFBR apresentou o melhor desempenho, com amplificação da região alvo em todos os isolados de *Salmonella* spp., e ausência de resultados falsos positivos e bandas inespecíficas. Utilizando este par, foi desenvolvido um protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina e em diferentes etapas de enriquecimento da metodologia convencional de detecção. Foram utilizadas amostras de carne bovina artificialmente inoculadas com *Salmonella* sp. nas concentrações aproximadas de  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC/ 25g. A detecção do patógeno foi possível em todas as concentrações inoculadas, e em todas as etapas de enriquecimento: Água Peptonada Tamponada após 18 h de incubação, caldo Soja Rappaport-Vassiliadis e caldo Müller-Kauffmann Tetrionato Novobiocina. Não foi possível a detecção de *Salmonella* spp. nas amostras sem enriquecimento. Esses resultados indicam que o protocolo proposto é viável na detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina em etapas intermediárias da metodologia convencional de isolamento, reduzindo o tempo requerido para obtenção de resultados finais.

Palavras chave: *Salmonella*; PCR; carne bovina

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de zoonoses em todo o mundo. Na União Europeia e no Brasil, *Salmonella* spp. são os principais causadores de toxinfecções alimentares (Brasil, 2011, EFSA, 2012). Nos Estados Unidos, mais de um milhão de casos de salmonelose ocorrem a cada ano (Scallan et al., 2011).

A carne bovina é um dos principais veículos envolvidos em casos de salmonelose, mas diversos outros alimentos podem ser fonte de contaminação por *Salmonella* spp., como carne de frango, ovos, leite, frutas, vegetais e pescados (Carrasco et al., 2012, Jay et al., 2005). Dessa forma, a detecção desse patógeno em alimentos é essencial para o diagnóstico de toxinfecções alimentares e monitoramento da segurança alimentar.

Os métodos convencionais de detecção de *Salmonella* spp. consistem basicamente nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo, testes bioquímicos e de soroaglutinação, e geralmente demoram vários dias. As metodologias alternativas de detecção, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são desenvolvidas com o intuito de reduzir o tempo de análise, obter resultados mais sensíveis e específicos, melhorar o fluxo de manipulação de amostras e possibilitar a automação dos laboratórios (Jasson et al., 2010, Mandal et al., 2011).

Na área de microbiologia de alimentos, a PCR é usada principalmente na detecção de micro-organismos patogênicos (Harris e Griffiths, 1992). Apesar de ser mais específica e sensível, a PCR, como toda técnica, tem suas limitações. Os componentes do alimento podem causar interferências na reação de amplificação, e as concentrações do microrganismo de



interesse podem estar abaixo do limite de detecção da técnica, levando a resultados falsos negativos (Wang et al., 1997). Além disso, não há distinção entre células vivas e mortas. Diversos procedimentos podem ser utilizados para minimizar esses problemas, como a homogeneização das amostras e extração do DNA (Kanki et al., 2009, Li e Mustapha, 2002).

Vários protocolos de detecção de *Salmonella* spp em alimentos utilizam o pré-enriquecimento de amostras em conjunto com a técnica de PCR (Gouws et al., 1998, Matias et al., 2010, Myint et al., 2006, Saroj et al., 2008, Vázquez-Novelle et al., 2005, Wang et al., 1997). O uso de uma etapa de enriquecimento antes do PCR permite a multiplicação dos micro-organismos que podem estar em baixas concentrações no alimento, aumentando a sensibilidade da técnica.

Apesar de existirem inúmeros protocolos para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, há uma grande variação de limite de detecção e eficiência. Além disso, muitos não utilizam um controle interno de amplificação (IAC), não havendo garantia de que os resultados negativos encontrados não sejam devido a inibições na PCR. Por esses motivos e pela importância desse patógeno, ainda é necessário o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias de detecção. Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar seis protocolos de PCR para detecção de *Salmonella* spp. e testar o mais eficiente em ensaios com carne bovina artificialmente contaminada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Avaliação de oligonucleotídeos iniciadores na detecção de *Salmonella* spp. por PCR

#### 2.1.1 Cepas bacterianas de referência e isolados de campo

Foram utilizados isolados de campo e cepas de referência de *Salmonella* spp. e outras bactérias (Tabela 1). As cepas de referência foram originadas das coleções American Type Culture Collection - Estados Unidos (ATCC), Bio Manguinhos FIOCRUZ - Brasil (BM) e National Collection of Type Cultures - Inglaterra (NCTC). Os isolados de campo foram originados de laboratórios de pesquisa da Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina, Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu, e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Esses isolados são provenientes de diversos alimentos de origem animal submetidos à metodologia convencional de detecção de *Salmonella* spp. e foram identificados por sorotipagem no Centro de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas - FIOCRUZ, Brasil.

As cepas de não-*Salmonella* foram selecionadas devido à proximidade filogenética com o gênero *Salmonella* ou por serem encontradas no mesmo ambiente que este patógeno.

### *2.1.2 Condições de cultivo e preparo das amostras de DNA*

As culturas foram recuperadas em caldo Triptona Soja (TSB), com incubação a 37 °C por 24 h. O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA). Após extração, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., EUA) e observado em transluminador.

Tabela 1. Cepas de *Salmonella* e não-*Salmonella* utilizadas

Cepa	Origem (Identificação) <sup>a</sup>	N° de isolados testados
<i>Salmonella</i>		
Abaetetuba	IC	4
Abony	NCTC (6017)	1
Agona	IC	4
Derby	IC	14
Dublin	IC	8
Enteritidis	ATCC (13076)	1
Give	IC	15
Infantis	IC	1
Mbandaka	IC	7
Meleagridis	IC	1
Newport	IC	1
Panama	IC	9
Typhi	ATCC (6539, 9992V, 10749, 19214, 19430), BM (NIH-T, Panama-TY2)	7
Typhimurium	ATCC (13311, 14028), IC	24
Worthington	IC	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> 4,5,12:i	IC	9
<i>S. enteria</i> subsp. <i>enterica</i> Cepa Rugosa	IC	5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	IC	3
Total de cepas de <i>Salmonella</i>		115
Não- <i>Salmonella</i>		
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC (33559)	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC (33560)	1

<sup>a</sup> IC: Isolado de campo; NCTC: National Collection of Type Cultures; ATCC: American Type Culture Collection; BM: Bio Manguinhos FIOCRUZ

Continuação da Tabela 1.

Cepa	Origem (Identificação) <sup>a</sup>	N° de isolados testados
<i>Citrobacter freundii</i>	IC	50
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC (15947)	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IC	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC (23355), IC	11
<i>Enterobacter intermedium</i>	IC	4
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (11229)	1
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC (11604)	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC (13883), IC	8
<i>Klebsiella spp.</i>	IC	3
<i>Listeria innocua</i>	ATCC (33090)	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC (15313, 19112, 19117)	3
<i>Morganella morganii</i>	IC	1
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC (29906)	1
<i>Providencia rettgeri</i>	ATCC (29944)	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IC	3
<i>Raoutella planticola</i>	ATCC (8329)	1
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC (14756)	1
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC (13313)	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (12598, 12600, 14458, 29213)	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228)	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC (27851)	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	ATCC (29971)	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC (9610)	1
Total de cepas de não- <i>Salmonella</i>		104

<sup>a</sup> IC: Isolado de campo; NCTC: National Collection of Type Cultures; ATCC: American Type Culture Collection; BM: Bio Manguinhos FIOCRUZ

### 2.1.3 Oligonucleotídeos iniciadores

Com exceção do par SIFBF/SIFBR, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram publicados anteriormente e são comumente usados em diversos estudos na detecção de *Salmonella* spp. Suas sequências, regiões alvo de amplificação, tamanho dos produtos de PCR e referências estão na Tabela 2.

Os oligonucleotídeos SIFBF e SIFBR foram desenhados, utilizando o programa DNAMAN (versão 4.0; Lynnon Corp., Canadá), a partir da sequência do gene *sifB*, que é um gene efetor da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 2 (SPI-2) relacionado a um Sistema de Secreção Tipo III (Freeman et al., 2003, Miao e Miller, 2000).

### 2.1.4 Eficiência dos protocolos de PCR

Na avaliação da eficiência dos oligonucleotídeos na detecção de *Salmonella* spp. por PCR, foi utilizado o DNA extraído das cepas listadas na Tabela 1. Cada reação de PCR continha 2 µL da amostra de DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 10 µM de cada oligonucleotídeo, e água livre de nuclease em quantidade necessária para completar o volume final de 25 µL. A reação de amplificação ocorreu com uma etapa de desnaturação inicial, seguida de 30 ou 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, e uma etapa final de extensão. As temperaturas e duração de cada etapa variaram de acordo com os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 3). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, posteriormente corado

com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., EUA) e observado em transiluminador UV.

Para avaliação da eficiência dos protocolos de PCR, foram calculadas as sensibilidades, especificidades, valores preditivos positivos e negativos dos oligonucleotídeos iniciadores, utilizando as seguintes fórmulas (Malorny et al., 2003a, Medronho e Perez, 2008, Tarabla, 2000):

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (\%)} = \frac{VP}{VP+FP} \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (\%)} = \frac{VN}{VN+FN} \times 100$$

Onde VP (verdadeiros positivos) são os isolados de *Salmonella* spp. que tiveram resultados positivos na PCR, VN (verdadeiros negativos) são os isolados de não-*Salmonella* que tiveram resultados negativos na PCR, FP (falsos positivos) são os isolados de não-*Salmonella* que tiveram resultados positivos na PCR, e FN (falsos negativos) são os isolados de *Salmonella* spp. que tiveram resultados negativos na PCR.

### 2.1.5 Sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR com o par de oligonucleotídeos SIFBF/SIFBR foram purificados e sequenciados pela MacroGen Inc. (Coréia).

Os resultados do sequenciamento foram analisados através do programa Sequencher™ (versão 4.1.4, Gene Codes Corp., EUA) e da ferramenta de alinhamento BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para confirmação da amplificação da região alvo do gene *sifB* (n° de acesso GenBank AF236076.1).



Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores avaliados na detecção de *Salmonella* spp.

Região alvo	Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>sifB</i>	SIFBF SIFBR	CCAATTACTATCGGGAGAGG GATAGCGAGAGTTGTAACCG	498	N° de acesso GenBank AF236076.1
<i>ompC</i>	OMPCF OMPCR	ATCGCTGACTTATGCAATCG CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	204	Alvarez et al. (2004)
<i>ompC</i>	S18 S19	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT	159	Kwang et al. (1996)
<i>invA</i>	139 141	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Rahn et al. (1992)
<i>hns</i>	LHNS-531 RHNS-682	TACCAAAGCTAAACGCGCAGCT TGATCAGGAAATCTTCCAGTTGC	152	Jones et al. (1993)
Fragmento cromossomal	ST11 ST15	AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA GGTAGAAATCCCAGCGGGTACTG	429	Aabo et al. (1993)

Tabela 3. Condições de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Oligonucleotídeos	Condições de amplificação					N° de ciclos
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	
SIFBF/SIFBR	94 °C/1 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/1 min	30
OMPCF/OMPCR	95 °C/2 min	95 °C/1 min	57 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/5 min	30
S18/S19	95 °C/1 min	95 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/4 min	30
139/141	95 °C/1 min	95 °C/30 s	60 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/7 min	35
LHNS-531/RHNS-682	94 °C/3 min	94 °C/30 s	60 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min	30
ST11/ST15	95 °C/1 min	95 °C/30 s	60 C°/30 s	72 °C/30 s	72 °C/4 min	30

## 2.2 Detecção de *Salmonella* spp. por PCR em etapas de enriquecimento de carne bovina artificialmente contaminada

### 2.2.1 Amostras de carne e inoculação de *Salmonella* sp.

Amostras de carne bovina foram adquiridas no comércio local. Para minimizar possíveis contaminações, as porções externas das peças foram assepticamente descartadas. De cada peça de carne, foram retiradas quatro unidades analíticas de 25 g e acondicionadas em bolsas estéreis. Nas bolsas, foi inoculado 1 mL de *Salmonella* sp. nas concentrações  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL (Tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente). Na inoculação, foi utilizada cultura de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 recuperada em caldo TSB, incubada a 37 °C por 24 h, e submetidas à diluição seriada em escala decimal em NaCl 0.85% (m/v). Ao controle negativo foi adicionado 1 mL de solução salina estéril (Tratamento N). Após inoculação, as amostras foram homogeneizadas manualmente e incubadas a 7 °C por 30 minutos para absorção.

Para confirmação da concentração dos inóculos, as diluições da cultura de *Salmonella* sp. foram semeadas em duplicata em Ágar Triptona Soja (TSA), com incubação a 37 °C por 24 h e posterior enumeração das colônias formadas (resultados finais expressos em Unidades Formadoras de Colônias por 25 g de carne bovina inoculada).

Esse procedimento de inoculação de *Salmonella* sp. em amostras de carne bovina foi repetido seis vezes.

### 2.2.2 Detecção convencional de *Salmonella* spp.

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. utilizado foi o padrão ISO 6579:2002 (ISO, 2002). Foram adicionados 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) às amostras, com incubação a 37 °C por 18 h. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para caldo Soja Rappaport-Vassiliadis (RVS) e de 1 mL para caldo Müller-Kauffmann Tetrionato Novobiocina (MKTTn), com incubação a 41,5 °C e 37 °C, respectivamente, por 24 h. Uma alçada de cada caldo foi semeada em placas do Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com incubação a 37 °C por 24 h, e posterior observação de colônias típicas de *Salmonella* spp.

### 2.2.3 Detecção de *Salmonella* por PCR

Alíquotas de 1 mL foram obtidas das etapas de enriquecimento da metodologia convencional de detecção de *Salmonella* spp.: APT antes da incubação, APT após incubação, caldo RVS após incubação e caldo MKTTn após incubação. Todas as alíquotas foram submetidas ao protocolo de extração de DNA descrito anteriormente.

A PCR foi feita utilizando os oligonucleotídeos iniciadores SIFBF/SIFBR e U1/U2 na mesma reação. Os oligonucleotídeos U1 (CAGCMGCCGCGGTAATWC) e U2 (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT), baseados em uma região conservada do RNAr 16S, foram utilizados como controle interno de amplificação (IAC), com o tamanho esperado de banda de 408 pares de base (pb) (Border et al., 1990, Lane et al., 1985). As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas anteriormente para o par SIFBF/SIFBR (Tabela 3), com exceção da temperatura de anelamento,

que passou para 49 °C. Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, posteriormente corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., EUA) e observado em transiluminador UV.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Avaliação de oligonucleotídeos na detecção de *Salmonella* spp. por PCR

Nesta primeira etapa, algumas condições de amplificação dos protocolos originalmente descritos foram alteradas para otimizar as reações, permitir a amplificação adequada das regiões alvo de *Salmonella* spp. e minimizar a presença de produtos de amplificação inespecíficos.

Os seis pares de oligonucleotídeos determinaram resultados positivos para todos os isolados de *Salmonella* testados. Em outros estudos, os oligonucleotídeos 139/141 não foram capazes de detectar algumas cepas de *Salmonella* Litchfield, *S. Senftenberg*, *S. Pullorum*, *S. Saintpaul* e *S. enterica* subsp. *arizonae* (Malorny et al., 2003a, Moganedi et al., 2007, Rahn et al., 1992). Malorny et al. (2003a) não conseguiram detectar cepas de *S. Enteritidis* e *S. bongori* utilizando o par S18/S19, e uma cepa de *S. enterica* subsp. *arizonae* utilizando o par ST11/ST15. Com exceção de *S. Enteritidis*, que foi detectada adequadamente em todas as PCRs, esses sorovares de *Salmonella* não foram testados no presente estudo.

Os oligonucleotídeos OMPCF/OMPCR, S18/S19, 139/141, LHNS-531/RHNS-682 e ST11/ST15 apresentaram bandas inespecíficas para diversos isolados de *Citrobacter freundii*, incluindo produtos de PCR com tamanhos semelhantes à região alvo, considerados como resultados falsos positivos. O par S18/S19 também teve resultado falso positivo para *Klebsiella* spp..

Gooding e Choudary (1999) observaram bandas no tamanho esperado para *Salmonella* spp. em cepas de *Citrobacter freundii* quando utilizando os oligonucleotídeos ST11/ST15, e em cepas de *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* quando utilizando o par S18/S19. Múltiplas bandas inespecíficas foram observadas com esses dois pares de iniciadores em outras cepas de bactérias, como *Hafnia alvei*, *Shigella sonnei* e *Yersinia enterocolitica*. Malorny et al. (2003a) encontraram resultados similares, com bandas inespecíficas para *Citrobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Klebsiella oxycotan* ao utilizar o par ST11/ST15, e *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei* e outras bactérias ao utilizar o par S18/S19.

No presente estudo, o par 139/141 apresentou bandas inespecíficas para isolados de *Campylobacter coli*, *Raoutella planticola*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* e *Listeria innocua*, mas de peso molecular maior e tamanho distinguível da banda esperada de 284 pb. Outros estudos utilizando esses mesmos iniciadores apresentaram resultados similares. Rahn et al. (1992) observaram bandas inespecíficas em diversas cepas de não-*Salmonella*, incluindo *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. Moganedi et al. (2007) obtiveram bandas inespecíficas em isolados de *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e Löfström et al. (2004) observaram resultados similares em isolados de *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermanii*, *Kluyvera ascorbata*, *Providencia rettgeri* e *Serratia rubidea*.

A sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos de cada par de oligonucleotídeos estão na Tabela 4. A

sensibilidade expressa a capacidade da PCR de identificar corretamente as cepas de *Salmonella*, a especificidade expressa a capacidade da PCR identificar corretamente as cepas de não-*Salmonella*, o valor preditivo positivo expressa a probabilidade de um isolado com resultado positivo na PCR ser realmente *Salmonella* spp. e o valor preditivo negativo expressa a probabilidade de um isolado com resultado negativo na PCR realmente não ser *Salmonella* spp. Como todos os isolados de *Salmonella* sp. foram corretamente identificados nas PCRs com os seis pares de oligonucleotídeos iniciadores testados, suas sensibilidades e valores preditivos negativos foram 100%.

Tabela 4. Indicadores de validade calculados para os oligonucleotídeos iniciadores testados

Oligonucleotídeos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor preditivo positivo (%)	Valor preditivo negativo (%)
SIFBF/SIFBR	100	100	100	100
OMPCF/OMPCR	100	98,08	98,29	100
S18/S19	100	96,15	96,64	100
139/141	100	95,19	95,83	100
LHNS-531/RHNS-682	100	93,27	94,26	100
ST11/ST15	100	89,42	91,27	100

O sequenciamento dos produtos de PCR dos oligonucleotídeos SIFBF/SIFBR confirmou que a região alvo do gene *sifB* de *Salmonella* spp. foi amplificada.

O par SIFBF/SIFBR foi o único a não apresentar bandas inespecíficas ou resultados falsos positivos, tendo os maiores valores de especificidade e preditividade positiva, sendo assim considerado o par de oligonucleotídeos de melhor desempenho nesta etapa do estudo.



### 3.2 Detecção de *Salmonella* spp. por PCR em etapas de enriquecimento de carne bovina artificialmente contaminada

Na Tabela 5, observam-se as frequências de detecção de *Salmonella* spp. pela metodologia convencional de detecção e por PCR nas amostras de carne bovina artificialmente contaminadas. A eletroforese em gel de agarose da PCR de uma das amostras de carne é mostrada na Figura 1. Apesar de não terem sido observadas bandas inespecíficas quando os oligonucleotídeos SIFBF/SIFBR foram utilizados na detecção de culturas puras na primeira etapa deste estudo, quando utilizado em conjunto com o IAC em amostras de carne artificialmente contaminadas houve o aparecimento de bandas inespecíficas fracas em algumas reações, de tamanhos superiores a 800 pb.

Tabela 5. Frequência de resultados positivos para *Salmonella* sp. em carne bovina artificialmente contaminada<sup>a</sup>

Tratamento <sup>b</sup>	Concentração inicial <sup>c</sup>	ISO 6579:2002	PCR			
			APT-0 <sup>d</sup>	APT-18 <sup>d</sup>	RVS <sup>e</sup>	MKTTn <sup>e</sup>
TN	0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
T1	1,17 ± 0,20	6/6	0/6	6/6	6/6	6/6
T2	2,06 ± 0,14	6/6	0/6	6/6	6/6	6/6
T3	3,04 ± 0,12	6/6	0/6	6/6	6/6	6/6

<sup>a</sup> Os dados estão representados como resultados positivos/total de repetições.

<sup>b</sup> TN: Controle negativo (salina estéril); T1: 10<sup>1</sup> UFC/mL; T2: 10<sup>2</sup> UFC/mL; T3: 10<sup>3</sup> UFC/mL.

<sup>c</sup> Média e desvio padrão (exceto para TN) em log UFC/mL de *Salmonella* sp. inoculada.

<sup>d</sup> APT-0: Água Peptonada Tamponada antes da incubação; APT-18: Água Peptonada Tamponada após incubação de 18 h.

<sup>e</sup> RVS: Caldo Soja Rappaport-Vassiliadis; MKTTn: Caldo Müller-Kauffmann Tetrionato Novobiocina.

Os controles negativos, nos quais não se adicionou *Salmonella* à carne, tiveram resultados negativos tanto na detecção convencional pela ISO 6579:2002 (ISO, 2002), quanto pela PCR, confirmando a ausência

prévia de *Salmonella* spp. nas peças de carne utilizadas no ensaio de inoculação.

Em todas as PCRs observou-se a banda de 408 pb, relativa à amplificação pelos oligonucleotídeos U1/U2. Esses oligonucleotídeos foram usados como IAC, conforme proposto por Border et al. (1990). O uso do IAC permitiu descartar a possibilidade de que os resultados negativos fossem devido à inibição da reação de amplificação (Hoorfar et al., 2003).

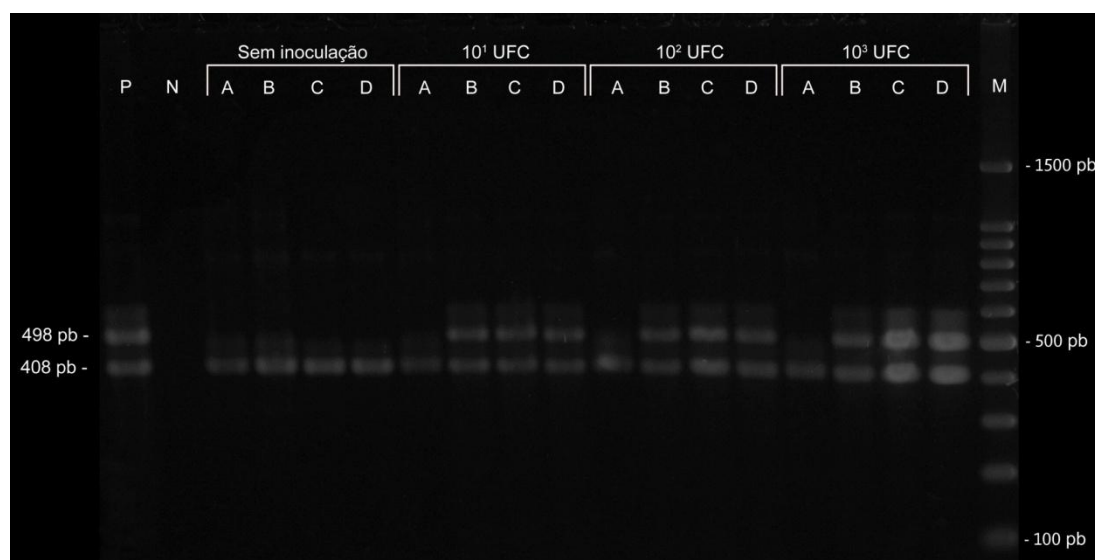


Figura 1. Detecção de *Salmonella* sp. por PCR em caldos de enriquecimento de amostras de carne bovina artificialmente contaminada. As amostras de carne foram inoculadas com *Salmonella* sp. nas concentrações  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  UFC por 25 g. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores SIFBF/SIFBR (498 pb) e U1/U2 (408 pb). P: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Controle positivo); N: Água (Controle negativo); A: Água Peptonada Tamponada antes da incubação; B: Água Peptonada Tamponada após incubação; C: Caldo Soja Rappaport-Vassiliadis; D: Caldo Müller-Kauffmann Tetracionato Novobiocina; M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Entre as causas de inibições em reações de PCR estão substâncias presentes nos meios usados nas etapas de enriquecimento (Rossen et al., 1992). Hyeon et al. (2010) avaliaram o efeito inibitório dos meios de enriquecimento APT, RVS e MKTTn em um ensaio de PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* spp. A adição de APT à reação de PCR teve resultado próximo ao do controle, enquanto adição de RVS e MKTTn teve efeito inibitório consideravelmente maior. Na presença de altas concentrações de MKTTn, a detecção de *Salmonella* sp. não foi possível. Esses achados são similares aos de Stone et al. (1994), que não conseguiram detectar *Salmonella* spp. ao utilizar os caldos Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrionato (TT) no enriquecimento de amostras antes da PCR. Os caldos RVS e MKTTn são modificações dos caldos RV e TT, respectivamente, tendo basicamente a mesma composição do meio original. O efeito inibitório encontrado nesses trabalhos pode ter sido causado pelas substâncias que tornam esses meios seletivos, como sais biliares e cloreto de magnésio (Hyeon et al., 2010, Rossen et al., 1992, Stone et al., 1994).

No presente estudo, foi possível a detecção de *Salmonella* spp. em todas as concentrações inoculadas, incluindo  $10^1$  UFC/25 g, pela metodologia convencional (ISO, 2002) e PCR (Tabela 5). Contudo, pelo método de PCR, a detecção só ocorreu após incubação nos meios de enriquecimento, não sendo possível a partir das amostras apenas diluídas em APT sem incubação. Esse resultado foi consistente com outros trabalhos e mostrou a necessidade do patógeno se multiplicar durante o enriquecimento da amostra para atingir concentrações que possibilitem sua

detecção adequada pela técnica de PCR (Gouws et al., 1998, Myint et al., 2006).

Outras vantagens do uso de etapa de enriquecimento combinada à técnica de PCR é a redução do risco de amplificação de DNA pertencente a células mortas e a menor possibilidade de inibições da PCR devido à diluição de substâncias inibitórias presentes nos alimentos (Aabo et al., 1993, Cocolin et al., 1998, Sharma e Carlson, 2000).

No protocolo de PCR desenvolvido neste trabalho, o tempo de incubação de APT avaliado foi de 18 horas, por ser o utilizado na metodologia convencional (ISO, 2002). Em estudos futuros com este ensaio de PCR, tempos menores de incubação devem ser testados, uma vez que em outros trabalhos o período ideal de incubação variou de 5 a 18 h (Croci et al., 2004, Myint et al., 2006, Trkov et al., 1999, Yeh et al., 2002). Agarwal et al. (2002) testaram vários alimentos e obtiveram diferentes limites de detecção para diferentes tempos de incubação, mas sugeriram a utilização de um período de enriquecimento de 6 h para alimentos em geral. Esse período é o mesmo sugerido por Ferretti et al. (2001).

Para validação do protocolo de PCR proposto neste trabalho, com a utilização dos oligonucleotídeos SIFBF e SIFBR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne bovina, ainda é necessária a realização de testes em amostras de carne naturalmente contaminadas, uma vez que pode haver diferença no desempenho de protocolos de PCR nesse tipo de amostra em comparação a amostras artificialmente contaminadas (Candrian, 1995, Gouws et al., 1998, Waage et al., 1999). Também é essencial a

realização de estudos interlaboratoriais para avaliação da reprodutibilidade e robustez da técnica (Hoorfar et al., 2004, Malorny et al., 2003b).

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo avaliou seis pares de oligonucleotídeos quanto ao desempenho na detecção de *Salmonella* spp. por PCR. Os oligonucleotídeos SIFBF e SIFBR, desenhados a partir da sequência do gene *sifB*, obtiveram os melhores resultados, detectando isolados de *Salmonella* sp. de diferentes sorovares, e não amplificando isolados de outras bactérias. Utilizando este par de oligonucleotídeos, foi desenvolvido protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina. Este protocolo foi testado em amostras de carne bovina artificialmente contaminadas, nas quais foi possível a detecção de *Salmonella* spp. após incubação em caldos de enriquecimento. O protocolo de PCR proposto se mostrou uma ferramenta útil na detecção de *Salmonella* spp. em carne e, após validação através de ensaios com amostras de carne naturalmente contaminadas e estudos interlaboratoriais, poderá ser implementado como teste de rotina em laboratórios de análise de alimentos e indústrias. Também poderá se tornar base no desenvolvimento de outras metodologias moleculares de detecção de *Salmonella* spp., como Nested-PCR e PCR em tempo real.

## REFERÊNCIAS

Aabo, S., Rasmussen, O.F., Roseen, L., Sørensen, P.D., Olsen, J.E., 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 7, 171-178.

Agarwal, A., Makker, A., Goel, S.K., 2002. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. Mol. Cell. Probes. 16, 243-250.

Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42, 1734-1738.

Border, P.M., Howard, J.J., Plastow, G.S., Siggens, K.W., 1990. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 11, 158-162.

Brasil, 2011. Dados Epidemiológicos - DTA Período de 2000 a 2011\*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Portal da Saúde - Doenças Transmitidas por Alimentos. Acessado em 04 de Agosto de 2012. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550)>

Candrian, U., 1995. Polymerase chain reaction in food microbiology. J. Microbiol. Methods. 23, 89-103.

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R.M., 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Res. Int.* 45, 545-556.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 1998. Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *J. Appl. Microbiol.* 85, 673-677.

Croci, L., Delibato, E., Volpe, G., De Medici, D., Palleschi, G., 2004. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1393-1396.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal.* 10, pp. 442.

Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G., Clementi, F., 2001. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 977-978.

Freeman, J.A., Ohl, M.E., Miller, S.I., 2003. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the *Salmonella*-containing vacuole. *Infect. Immun.* 71, 418-427.

Gooding, C.M., Choudary, P.V., 1999. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 13, 341-347.



Gouws, P.A., Visser, M., Brözel, V.S., 1998. A Polymerase Chain Reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. J. Food Prot. 61, 1039-1042.

Harris, L.J., Griffiths, M.W., 1992. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). Food Res. Int. 25, 457-469.

Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. J. Clin. Microbiol. 41, 5835.

Hoorfar, J., Wolffs, P., Rådström, P., 2004. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. APMIS. 112, 808-814.

Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Park, C., Choi, I.S., Seo, K.H., 2010. Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella* Enteritidis using real-time PCR assay. J. Vet. Sci. 11, 143-149.

International Organization for Standardization (ISO), 2002. ISO 6579:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiol. 27, 710-730.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. Modern Food Microbiology (7<sup>a</sup> ed.). Nova York, NY: Springer.

Jones, D.D., Law, R., Bej, A.K., 1993. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using Polymerase Chain Reactions (PCR) and gene probes. J. Food Sci. 58, 1191-1197.

Kanki, M., Sakata, J., Taguchi, M., Kumeda, Y., Ishibashi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Yamasaki, W., Inoue, K., Miyahara, M., 2009. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. Food Microbiol. 26, 1-3.

Kwang, J., Littledike, E.T., Keen, J.E., 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. Lett. Appl. Microbiol. 22, 46-51.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6955-6959.

Li, Y., Mustapha, A., 2002. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. Lett. Appl. Microbiol. 35, 508-512.

Löfström, C., Knutsson, R., Axelsson, C.E., Rådström, P., 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. Appl. Environ. Microbiol. 70, 69-75.

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R., 2003a. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl. Environ. Microbiol. 69, 290-296.

Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J., 2003b. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 39-48.

Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.* 6, 87-102.

Matias, B.G., Pinto, P.S., Cossi, M.V., Silva, A., Jr., Vanetti, M.C., Nero, L.A., 2010. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poult. Sci.* 89, 1524-1529.

Medronho, R.A., Perez, M.A., 2008. Testes Diagnósticos. In: R. A. Medronho, K. V. Bloch, R. R. Luiz, G. L. Werneck (Eds.), *Epidemiologia*. São Paulo, SP: Atheneu.

Miao, E.A., Miller, S.I., 2000. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 7539–7544.

Mogamedi, K.L.M., Goyvaerts, E.M.A., Venter, S.N., Sibara, M.M., 2007. Optimisation of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water S. A.* 33, 195-202.

Myint, M.S., Johnson, Y.J., Tablante, N.L., Heckert, R.A., 2006. 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 Microbiol. 23, 599-604.

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C., Curtiss Iii, R., Gyles, C.L., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes. 6, 271-279.

Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int. J. Food Microbiol. 17, 37-45.

Saroj, S.D., Shashidhar, R., Karani, M., Bandekar, J.R., 2008. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture – Nested PCR combination assay. Mol. Cell. Probes. 22, 201-206.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. Emerging Infect. Dis. 17, 7-15.

Sharma, V.K., Carlson, S.A., 2000. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5472-5476.

Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., McVey, S., Chengappa, M.M., 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. J. Clin. Microbiol. 32, 1742-1749.

Tarabla, H.D., 2000. Epidemiología Diagnóstica Santa Fé, SF: Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión, Universidad Nacional del Litoral.

Trkov, M., Majeríková, I., Jerašek, B., Štefanovičová, A., Rijpens, N., Kuchta, T., 1999. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. Food Microbiol. 16, 393-399.

Vázquez-Novelle, M.D., Pazos, A.J., Abad, M., Sánchez, J.L., Pérez-Parallé, M.L., 2005. Eight-hour PCR-based procedure for the detection of *Salmonella* in raw oysters. FEMS Microbiol. Lett. 243, 279-283.

Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G., 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. J. Appl. Microbiol. 87, 418-428.

Wang, R.F., Cao, W.W., Cerniglia, C.E., 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J. Appl. Microbiol. 83, 727-736.

Yeh, K.S., Chen, T.H., Liao, C.W., Chang, C.S., Lo, H.C., 2002. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species. Int. J. Food Microbiol. 78, 227-234.