

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

Flávia Andrade Ribeiro

Desempenho de métodos convencionais e alternativos para detecção
de *Salmonella* spp. em carcaças de frango

**Machado/MG
2019**

FLÁVIA ANDRADE RIBEIRO

**DESEMPENHO DE MÉTODOS CONVENCIONAL E
ALTERNATIVOS PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* spp.
EM CARCAÇAS DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sandra Maria Oliveira
Morais Veiga
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Antônio
Colombo

**Machado/MG
2019**

R373d Ribeiro, Flávia Andrade.

Desempenho de métodos convencional e alternativos para detecção de salmonella spp. em carcaças de frango / Flávia Andrade Ribeiro. – Machado: [s.n.], 2019.

47 p. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação,

Ciência e

Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado

Inclui bibliografia.

1. Frango de Corte – Carcaças. 2. Salmonela. 3. Segurança alimentar.
4. Saúde pública.

636.0894

FLÁVIA ANDRADE RIBEIRO

Desempenho de métodos convencional e alternativos para detecção de
Salmonella spp. em carcaças de frango

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 30 de abril de 2019

Prof^a. Dr^a. Dalila Carvalho Rezende
IFSULDEMINAS - Campus Machado

Dr. Carlos Eduardo Garcia
IBERPHARM do Brasil

Prof^a. Dra. Sandra M.O. M. Veiga
UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas

A Deus, pela força de vontade; aos meus pais, pelo incentivo, apoio e confiança; a minha irmã e ao meu namorado, por sempre acreditar na minha capacidade; e a todos que sempre estiveram do meu lado demonstrando que somos capazes de buscar os nossos sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos e me permitir chegar ao final dessa etapa.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Sandra Maria de Oliveira Morais Veiga, pela orientação, amizade, paciência, confiança e estímulo na realização deste trabalho;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo pelo apoio, orientação e esforço dedicado para o meu aprimoramento profissional;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que me apoiaram, estimularam e permitiram entender o que é ser um “Mestre”;

Aos colegas que sempre estiveram a meu lado quando as dificuldades apareciam para dar apoio e mostrar que é difícil para todos, mas que vale a pena;

Às funcionárias do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico pelo apoio, paciência, confiança e dedicação nas minhas ausências para a realização desse trabalho;

A todos meus amigos e familiares que me incentivaram, apoiaram e compreenderam as minha ausência durante esses dois anos;

À Mestre Juliana Barbosa Nunes do Laboratório de Biotecnologia da UNIFAL/MG que empenhou se em ensinar e me mostrar que nas dificuldades sempre temos que acreditar que vai dar certo;

E a todos que mesmo indiretamente colaboraram com este trabalho;

Finalmente, gostaria de agradecer a meus pais, minha irmã, meu cunhado, meus sobrinhos e ao meu namorado, pela infinita dedicação e apoio. Sem vocês minha vida e todo esse trabalho não teriam sentido. Vocês, sem dúvida, são os alicerces desta conquista.

Deixo aqui o meu, MUITO OBRIGADA, a todos vocês!!!!

RESUMO

Dentre os micro-organismos patogênicos importantes em aves, capazes de causar zoonose de origem alimentar em humanos, destaca-se a *Salmonella* spp. A salmonelose humana compreende uma das zoonoses de difícil controle, elevada morbidade e impactos sócios e econômicos. A maioria dos casos de toxinfecção alimentar proveniente por *Salmonella* spp. está relacionada com o consumo de alimentos contaminados, consumidos crus e/ou preparados sob condições impróprias de higiene, manipulação e conservação. As análises para detecção de *Salmonella* spp. são de grande importância para agroindústria. Cada vez mais, há necessidade de identificar os micro-organismos patogênicos com rapidez e segurança que permitam o monitoramento da qualidade microbiológica dos alimentos, seja pela indústria ou pelos órgãos de fiscalização, desta forma, diversos métodos alternativos têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de *Salmonella* spp. Esta dissertação teve como objetivo avaliar o desempenho de métodos convencionais e alternativos para detecção de *Salmonella* spp em carcaças de frangos. Foram analisadas 90 carcaças de frango, sendo 45 carcaças de frango “in natura” de três produtores com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e 45 carcaças de frango artificialmente contaminadas com cepa padrão de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Todas as amostras foram analisadas pelo método convencional, ISO 6579 e pelos métodos alternativos ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay - VIDAS SLM) e PCR em tempo real (Reação em Cadeia pela Polimerase). Para as amostras com contaminação natural, foram detectadas 15,6% de positividade pelos métodos convencional e PRC tempo real. E pelo método VIDAS®-SLM, foram detectados 22% de *Salmonella* spp. Já nas amostras contaminadas artificialmente, detectaram-se 82% de positividade pelo método convencional, 80% pelo PRC tempo real e 27% pelo VIDAS®-SLM. De acordo com os resultados obtidos, a técnica VIDAS®-SLM apresentou resultado superior na detecção de *Salmonella* spp, em amostras “in natura” e nas amostras contaminadas artificialmente o método PCR em tempo real apresentou maior capacidade de detecção, porém não houve diferença estatística entre os métodos.

Palavras-chave: Qualidade, Metodologias, DTA's

ABSTRACT

Among the important pathogenic microorganisms in chickens, capable of causing food-borne zoonosis in humans, *Salmonella* spp. Human salmonellosis comprises one of the difficult-to-control zoonoses, high morbidity and social and economic impacts. Most cases of food poisoning from *Salmonella* spp. is related to the consumption of contaminated food, consumed raw and / or prepared under improper conditions of hygiene, handling and conservation. Analysis for detection of *Salmonella* spp. are of great importance to agro-industry. Increasingly, there is a need to quickly and reliably identify pathogenic microorganisms that allow the monitoring of the microbiological quality of food, either by industry or by the surveillance agencies, thus, several alternative methods have been developed for detection and quantification. *Salmonella* spp. This dissertation aimed to evaluate the performance of conventional and alternative methods for detection of *Salmonella* spp in chicken carcasses. Ninety chicken carcasses were analyzed, being 45 "in natura" chicken carcasses from three producers registered at the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA and 45 chicken carcasses artificially contaminated with standard *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) and *Salmonella* strains. *enteritidis* (ATCC 13076). All samples were analyzed by conventional method, ISO 6579 and by alternative methods ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay - VIDAS SLM) and real time PCR (Polymerase Chain Reaction). For samples with natural contamination, 15.6% positivity was detected by conventional and real time PRC methods. And by the VIDAS®-SLM method, 22% of *Salmonella* spp. Already in artificially contaminated samples, 82% of positivity were detected by the conventional method, 80% by real time PRC and 27% by VIDAS®-SLM. According to the results obtained, the VIDAS®-SLM technique showed superior results in the detection of *Salmonella* spp. In real-time samples and artificially contaminated samples, the real-time PCR method showed higher detection capacity, but there was no statistical difference between the methods.

Key words: Quality, Methodologies, DTA's

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 QUALIDADE E SEGURANÇA DOS ALIMENTOS	11
2.2 SALMONELLA SPP.	13
2.3 SALMONELLA SPP. NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS	15
2.4 SALMONELOSE E SAÚDE PÚBLICA	16
2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS DE SALMONELLA SPP. EM ALIMENTOS	17
2.5.1 MÉTODO CONVENCIONAL	19
2.5.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS / RÁPIDOS	20
2.5.2.1 Técnica imunoenzimática	20
2.5.2.2 Técnica PCR em tempo real	21
3 REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	29
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAS E MÉTODOS	32
2.1 AMOSTRAS EXAMINADAS	32
2.2 DETECÇÃO DE SALMONELLA SPP.	32
2.2.1 Diluição inicial ou pré-enriquecimento não seletivo	32
2.2.2 Método Convencional – ISO 6579	33
2.2.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS OU RÁPIDOS	33
2.2.3.1 TÉCNICA IMUNOFLUORESCÊNCIA	33
2.2.3.2 Técnica molecular da reação em cadeia da polimerase - PCR em tempo real	34
2.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4 CONCLUSÃO	44

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores esperam adquirir alimentos de qualidade livres de qualquer agente contaminante capaz de causar danos à saúde, seja este físico, químico ou biológico.

Segundo Salles, et al.(2002) a produção e industrialização de alimentos isentos de bactérias patogênicas mesmo com a aplicação das Boas Práticas de Fabricação e dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional, bases da segurança da qualidade alimentar, se tornam difíceis na prática devido aos processos que mesmo conduzidos dentro das normas de higiene, possibilitam a sobrevivência de patógenos naturalmente presentes no alimento e no ambiente.

A ocorrência de infecções alimentares representa um grande problema para a saúde pública, devido à elevada frequência, taxa de mortalidade e pela ampla ocorrência de micro-organismos capazes de promover doenças transmitidas por alimentos (DTA's).

Segundo Gouvêa et al. (2012), desde a década de 70, a *Salmonella* spp. é um dos principais micro-organismos causadores de doença de origem alimentar, vinculada principalmente a produtos avícolas, tendo ampla distribuição em todo mundo, estando associada a prejuízos econômicos, dificuldades comerciais e queda na produção.

Sabe-se que com o passar dos anos o consumo de carne de frango no mundo e no Brasil aumentaram significativamente. Devido à este aumento e a necessidade de manter a qualidade, foram elaborados programas sanitários visando o controle e prevenção da contaminação por *Salmonella* spp. em toda a cadeia de produção avícola e de educação sanitária dos consumidores com o intuito de minimizar a veiculação da ingestão dos produtos avícolas à salmonelose.

O processamento e manipulação de produtos de origem animal pelas indústrias são considerados pontos importantes na contaminação de carcaça e produtos de origem animal por *Salmonella* spp. (BARROS et al., 2007).

A necessidade de melhorar cada vez mais a qualidade e diminuir a ocorrência de patógenos presentes nos alimentos faz com que também haja a necessidade de melhoria da tecnologia quanto à detecção destes patógenos.

Atualmente, um grande desafio para o controle das contaminações por *Salmonella* spp. é o seu diagnóstico rápido e preciso. O método analítico de diagnóstico mais utilizado é o ISO 6579 (International Standards Organization), que demanda tempo e trabalho para chegar ao

diagnóstico final, requerendo mais de cinco dias para confirmar um resultado positivo. Esse diagnóstico pode ter sua sensibilidade e especificidade questionada devido às grandes variações bioquímicas e variações genéticas que a *Salmonella* spp. pode apresentar. Além disso, a demora na obtenção de resultados pode comprometer as medidas de controle nas indústrias.

O tempo transcorrido entre o início e o término da análise microbiológica gera necessidade de estocagem da produção (necessidade de frio, espaço físico, estrutura de logística de distribuição, etc.) o que proporciona custos adicionais de produção. Quanto maior for o tempo para liberação dos resultados, maior será o tempo para a tomada de ações corretivas e preventivas em casos de desvios da qualidade.

O tempo exigido para a liberação do diagnóstico microbiológico pelo método convencional é uma das principais razões para o aumento do uso de novas metodologias de triagem para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, que buscam respostas rápidas para a solução de possíveis problemas durante o processo de produção, o que proporciona maior qualidade para o consumidor, além da possibilidade de redução de custos para o produtor.

Dentre as possíveis técnicas a serem empregadas, destacam-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e as técnicas imunológicas, como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (DICKEL et al, 2005).

Diante do exposto, este estudo visa verificar a incidência de *Salmonella* spp. e comparar o desempenho do método convencional frente aos métodos alternativos na detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frango.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade e Segurança dos Alimentos

Com o crescimento da população mundial e, conseqüentemente, da produção mundial de alimentos, a segurança dos alimentos se faz necessária com objetivos de diminuir a severidade e a quantidade de registros de doenças de origem alimentar causadas por micro-organismos e/ou suas toxinas.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), “segurança dos alimentos” pode ser considerada como a garantia de que o alimento não provocará dano ao consumidor quando for preparado e/ou consumido de acordo com o uso pretendido (FAO, 2003).

Nas últimas décadas, a indústria, juntamente com o governo, vem trabalhando colaborativamente na produção de alimentos de origem animal, para garantir a qualidade e segurança para o consumo humano, principalmente em relação a produtos avícolas.

As empresas alimentícias buscam, principalmente, atingir cada vez mais o valor de mercado dos produtos que serão entregues ao consumidor final. A segurança dos alimentos está relacionada aos aspectos qualitativos do alimento, já que os programas e normas utilizadas para medir o desempenho da produção fundamentam-se em práticas que propõe garantir as condições físicas, químicas e microbiológicas adequadas para a qualidade do produto (TALAMINI et al., 2005).

A segurança é considerada fator determinante para a qualidade do produto, pois qualquer problema pode colocar em risco a saúde do consumidor (FIGUEIREDO; NETO, 2001). Desta forma, a indústria utiliza sistemas onde a segurança, higiene e manutenção do valor nutricional dos produtos são elaborados, praticados e monitorados em busca da qualidade total do alimento (LELL; BASSI, 1998).

Dentre os principais parâmetros que determinam a qualidade de um alimento têm-se os ensaios microbiológicos, pois permitem a indústria avaliar às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e possíveis riscos à saúde da população (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Um alimento é considerado seguro quando seus constituintes ou contaminantes que causam perigo à saúde estejam ausentes ou abaixo do limite de risco (FRANCO; LANDGRAF, 2004). A contaminação microbiológica é considerada a mais problemática para à saúde humana, por ser responsável pela maior parte dos surtos de Doenças Transmitidas por

Alimentos. Contudo, ela pode ser bastante prevenida e controlada durante o manuseio e processamento dos alimentos (BARENDSZ, 1998).

Programas que visam a segurança alimentar devem proporcionar um controle efetivo em toda a cadeia alimentar desde a produção, armazenagem e distribuição, até chegar a mão do consumidor, do alimento *in natura* ou processado. Eles têm como objetivo garantir a qualidade dos alimentos produzidos, proporcionar um aumento da exportação, proporcionar ao setor produtivo brasileiro capacidade de atender às exigências dos países importadores, em termos de segurança dos alimentos, aumentado desta forma, a competitividade nas empresas.

No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu por meio da portaria nº1428/93, a utilização dos programas BPP (Boas Práticas de Produção) e APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) como ferramentas para inspeção de todo o processo de produção da indústria de alimentos.

O programa BPP é indicado para fabricação de produtos alimentícios, visando à eliminação ou redução dos riscos de contaminação microbiológica, química e física, fundamentando-se nas condições sanitárias necessárias e nas rotinas de inspeção. O sistema APPCC é um programa que busca garantir a inocuidade dos alimentos para o consumidor final, estabelecendo o controle de todo o processo produtivo, considerando a matéria-prima, o processamento, o ambiente e até os operadores envolvidos na produção (CARDOSO; TESSARI, 2008).

O controle da *Salmonella* spp. na avicultura envolve medidas de prevenção não só na indústria, mas também no campo, onde se busca a redução da incidência da bactéria. Mas devemos ressaltar que as boas práticas no preparo de alimento pelos consumidores também são importantes para a prevenção da salmonelose. Durante o processamento da carne, pode ocorrer a contaminação do próprio ambiente e a partir dos manipuladores, bem como a contaminação cruzada por meio de outras aves contaminadas (SILVA, 1998).

Devido à relação das aves com a disseminação da bactéria foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Portaria nº193/ 19/09/1994), com adoção de normas (Portaria nº 8, 23/01/1995) para prevenir e controlar a presença de *Salmonella* spp. em aves.

Em vista disso, o Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento propõe um “Programa de redução de patógenos - Monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus”, o que permite um monitoramento constante

do nível de contaminação por este micro-organismo patogênico em estabelecimentos de abate de aves, através da Instrução Normativa nº. 70 de 06 /10/2003 (BRASIL, 2003).

2.2 *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é um dos principais patógenos relacionados com doenças de origem alimentar. O micro-organismo é amplamente disseminado, fato que proporciona grande impacto na saúde e economia mundiais, e tem o homem como seu principal reservatório (JAY; 2005).

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

A bactéria *Salmonella* é um micro-organismo Gram-negativo, anaeróbico ou aeróbico facultativo, não esporulado, capaz de produzir ácido e gás pela fermentação da glicose, porém não metaboliza a lactose e a sacarose. São mesófilos com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C, possuem o crescimento ótimo em pH entre 6,5 e 7,5. Geralmente, são móveis com flagelos peritríquios com exceções da *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum* que não possuem motilidade. (LE MINOR, 1984; WRAY e WRAY, 2000; ICMSF, 2002; FORSHELL & WIERUP, 2006).

A classificação e a nomenclatura da *Salmonella* são complexas e, nos últimos anos sofreram inúmeras alterações (POPFF e LE MINOR, 1997). Atualmente, o gênero *Salmonella* possui duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* divide-se em seis supespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT & WEILL, 2007). A maioria dos sorotipos é produtora de gás, H₂S, lisina e ornitina descarboxilase positivos; urease e indol negativos e reduzem o nitrato a nitrito (CAMPOS, 2002).

A taxonomia do gênero *Salmonella* fundamenta-se na composição de seus antígenos de superfícies, que são os antígenos somáticos (O) de natureza lipopolissacarídica, os flagelos (H) de natureza proteica e os capsulares (Vi) (HOLT et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2004).

O gênero *Salmonella* possui um total de 2.579 sorotipos (Quadro 1), sendo 2.557 pertencem à *S. entérica* e 22 à *S. bongori* (GRIMONT & WEILL, 2007).

Quadro1 - Número de sorotipos presente em cada espécie e subsespécie de *Salmonella* spp.

<i>S. enterica</i>	2.557
<i>S. enterica enterica</i>	1.531
<i>S. enterica salamae</i>	505
<i>S. enterica arizonae</i>	99
<i>S. enterica diarizonae</i>	336
<i>S. enterica houtanae</i>	73
<i>S. enterica indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total (gênero <i>Salmonella</i>)	2.759

Adaptado de GRIMONT & WEILL (2007); OLIVEIRA (2000).

Já o esquema de Kauffmann-White (Quadro 2) é baseado na composição antigênica das bactérias do gênero *Salmonella* em relação aos seus antígenos somáticos (O), flagelar (H) e capsulares (Vi) (OLIVEIRA, 2000).

Quadro 2 Classificação - para as principais espécies de *Salmonella* spp segundo o esquema de Kauffmann-White

Grupo	Sorotipo	Antígeno "O"	Antígeno H	
			Fase1	Fase 2
A	Paratyphi	1, 2, 12	a	[1,5]
	Abortus equi	4, 12	-	e, n, x
	Abortus ovis	4, 12	c	1, 6
B	Typhimurium	1, 4, [5], 12	i	1, 2
	Paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
C1 e C4	Choleraesuis	6, 7	c	1, 5
	Typhi-suis	6, 7	c	1, 5
	Newport	6, 8, 20	e, h	1, 2
C2 e C3	Typhi	9, 12	d	-
	Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
D1 e D2	Dublin	1, 9, 12, [Vi]	g, p	-
	Gallinarum	1, 9, 12	-	-
	Pullorum	9, 12	-	-

Adaptado de GRIMONT & WEILL (2007); OLIVEIRA (2000).

Segundo Bhagwat et al.(2008) e Das et al.(2002), o gênero *Salmonella* também pode ser classificadas em dois grupos: sendo o primeiro responsável pela febre entérica, tifóide ou paratifóide (grupos A, B e C), e segundo, relacionado com os quadros clássicos de gastroenterite bacteriana aguda (sorotipos: *Enteritidis* e *Typhimurium*).

Diante a dificuldade de classificar a salmonela somente pelos antígenos de superfície, novas formas de classificação estão sendo utilizadas, sendo as mais importantes a biotipagem que se baseiam nas reações bioquímicas, a fagotipagem fundamentada na sensibilidade a

bacteriófagos específicos e a classificação segundo os plasmídios, denominada perfil plasmidial (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria com ampla distribuição geográfica, principalmente onde existe uma grande concentração de aves. O principal habitat é o trato intestinal de animais de sangue quente e de sangue frio (JAY, 2005). São consideradas fontes de *Salmonella* spp., matéria prima animal (carne e aves), rações animais (farinha de ossos, farinhas de sangue), gema de ovo, hortaliças, sendo frequente também as contaminação cruzadas entre os alimentos e as mãos dos funcionários, equipamentos, utensílios previamente contaminados (GARRICK, SMITH, 1994).

2.3 *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de frangos

O setor de avicultura brasileiro cresceu e sofreu inúmeras mudanças nos últimos anos, devido ao desenvolvimento e necessidades do mercado interno e aumento das exportações. Segundo Carvalho et al. (2002), o Brasil passou a ser o segundo maior produtor de frango.

Por ser uma carne saudável e de fácil acesso a população, em função da oferta do preço, é amplamente consumida. Entretanto, justamente por suas características nutritivas, alta atividade de água e pH próximo da neutralidade, pode se tornar veículo de transmissão de inúmeros micro-organismos, sendo alguns deles patogênicos ao homem, como exemplo, a *Salmonella* spp. (CARVALHO et al., 2002).

A carga microbiana de carcaças de frango e seus derivados são oriundos principalmente, dos animais vivos ou adquiridos durante as fases do abate, sendo as mais críticas a escaldagem, a depenagem e a evisceração. De acordo com Almeida e Silva (1992) a contaminação pode se tornar um problema, pelo fato das bactérias, incluindo a *Salmonella* spp., aderirem firmemente na pele da carcaça de frango e não serem facilmente removidas com a lavagem.

Cardoso et al. (2005) relatam que a maioria dos micro-organismos presentes nas aves são aeróbios mesófilos e poucos conseguem se desenvolver a temperaturas inferiores a 7° C. A detecção desse micro-organismo tem sido utilizada como indicador de qualidade higiênica dos alimentos e quando presentes em grandes quantidades, indicam falhas durante a produção.

São inúmeras as fontes de contaminação por *Salmonella* spp. em aves. Normalmente, as aves e outros animais quando contaminados são portadores inaparentes, mas podem apresentar infecção latente e, menos comumente, estarem clinicamente doentes. Esses animais

são considerados grandes reservatórios, podendo contaminar outros animais, seres humanos e o ambiente (POPPE, 2000).

A transmissão da *Salmonella* spp. entre as aves pode ocorrer por transmissão vertical e horizontal. A contaminação vertical é iniciada pela contaminação do ovo no trato reprodutivo ou ao passar pela cloaca por contaminação das fezes. A transmissão horizontal geralmente ocorre por via fecal-oral. Outras fontes de transmissão incluem roedores, aves silvestres e outros animais que favorecem a introdução e permanência da bactéria no ambiente (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Segundo Rose et al. (2000) e Davies e Breslin (2003), os principais problemas relatados em granjas comerciais de frango de corte, são os galpões contaminados e pintos de um dia infectados por *Salmonella* spp., já que os mesmos proporcionam uma rápida disseminação da bactéria.

A contaminação das aves também pode ocorrer pela presença da *Salmonella* spp. no ambiente de criação e posteriormente, sua disseminação para o local do abate, contaminando as carcaças e os demais produtos. Segundo Nascimento et al. (2000), mesmo quando o número de aves contaminadas com o patógeno é pequeno, a linha de abate pode ser toda contaminada.

O nível de contaminação por *Salmonella* spp. nas granjas e nos abatedouros sofre interferências de vários fatores como: a estação do ano, incubadora de origem, qualidade das rações nas fábricas, medidas de higiene e manejo dos animais (CARDINALE et al. 2004).

2.4 Salmonelose e Saúde Pública

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a segurança alimentar como um fator importante para a saúde pública e relata que aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morrem, devido doenças diarreicas por ano no mundo e que, normalmente, as mesmas estão ligadas a alimentos ou água contaminados (OMS, 2006). Dentre as doenças de origem alimentar, a salmonelose é a mais comum e encontra-se amplamente distribuída; estabelecendo assim, um problema de saúde pública e com grande demanda econômica para muitos países (OMS, 2005).

Segundo Pires et al. (2010), a *Salmonella* spp. normalmente é transmitida pela ingestão de alimentos de origem animal como ovos, carne de frango, carne suína ou bovina.

Esses alimentos são os principais relacionados com transmissão de salmonelose para seres humanos.

Andreatti Filho et al. (2009) relatam que a presença deste micro-organismo é considerada uma das mais importantes barreiras sanitárias internacionais, pois exige rigorosos programas de controle para reduzir sua incidência e perdas econômicas na cadeia avícola.

De acordo com as normas brasileiras vigentes, *Salmonella* spp. deve estar ausente em qualquer tipo de alimentos, já que a maioria dos sorovares desse gênero é patogênico ao homem.

No Brasil, apesar da subnotificação, a partir da década de 1970 vem ocorrendo um aumento acentuado e contínuo do número de casos associados às toxinfecções alimentares. Porém, as notificações normalmente são realizadas apenas em surtos que envolvem um número grande de pessoas ou quando a duração dos sintomas é mais longa (CARDOSO; TESSARI, 2008).

Segundo Jay (2005), a salmonelose é causada pelo consumo de alimentos que contenham concentrações em torno de 10^7 a 10^9 células por grama e possui como sintomas característicos: náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreias, que surgem após 12 horas da ingestão dos alimentos contaminados, podendo persistir de dois a sete dias. Todavia, esta dose infectante pode ser menor, conforme a virulência do subtipo, tipo de alimento e estado imune do paciente (HUMPHREY, 2004).

Entre 1999 e 2008, no país, foram investigados 3.984 surtos de salmonelose, sendo destes 23% relacionados a alimentos preparados a base de ovos crus e/ou mal cozidos, 17% causados pelo consumo de alimentos mistos, 12% por carnes vermelhas, 11% por sobremesas, 9% por água, 7% por leite e derivados e 21% não tiveram a causa definida (Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, 2008).

Segundo dados do Sinan/ SVS/ Ministério da Saúde entre 2008 a 2017 foram relatados 6793 casos de surto de DTA no país, sendo a residência o principal local de ocorrência (36,4%). Das DTA's registradas, 92% foram causados por bactérias sendo 30% por *Salmonella* spp. (BRASIL, 2018).

2.5 Métodos de diagnósticos de *Salmonella* spp. em alimentos

A análise microbiológica de um alimento verifica a presença ou a ausência de micro-organismo, assim como pode quantificar, identificar e caracterizar, de modo a constatar as

condições de higiene que o produto foi processado, os possíveis riscos à saúde do consumidor, a vida útil do alimento (tempo de prateleira) e se os padrões e especificações microbiológicas estão sendo atendidas adequadamente (GIOMBELLI, 2000).

Segundo Giombelli (2000) a metodologia escolhida deve ser direcionada de acordo com a precisão pretendida, custo, tempo de análise, aceitabilidade do método pelos órgãos oficiais, condições dos laboratórios e qualificação dos analistas.

Atualmente, um grande desafio para o controle das contaminações por micro-organismos patogênicos é o seu diagnóstico rápido e preciso. A busca por uma metodologia adequada e eficaz para detectar *Salmonella* spp. em alimentos e matérias primas tem sido uma constante entre os pesquisadores da área (GIOMBELLI, 2000).

Segundo Franco; Landgraf (2004), muitos métodos podem ser utilizados para determinação de um mesmo micro-organismo, porém a escolha do melhor método dependerá dos critérios adotados e da estrutura do laboratório.

Segundo os órgãos regulamentadores, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e Ministério da Saúde – ANVISA, para a detecção de *Salmonella* spp. Recomenda-se o método convencional, porém este pode ter sua sensibilidade e especificidade questionada devido às grandes variações bioquímicas e mutações genéticas que o micro-organismo pode apresentar (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

O método tradicional é bastante sensível, com limite de detecção de uma unidade formadora de colônia/25g de amostra, porém, é trabalhoso e lento, o que limita a capacidade de análise dos laboratórios. A etapa mais cara, mais trabalhosa e mais demorada é a confirmação, porque envolve a caracterização sorológica e bioquímica de várias colônias, isoladas das placas de meios seletivos diferenciais. Em função disso, há um grande interesse por métodos alternativos mais rápidos e mais simples, que possam ser utilizados em lugar do método convencional (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos métodos com o objetivo de produzir resultados rápidos e analisar várias amostras ao mesmo tempo (JASSON et al., 2010). Esses métodos baseiam-se na utilização de meios de cultivos cromogênicos, em imunoenaios, na detecção de antígenos, na análise de bacteriófagos ou em métodos moleculares que detectam ácidos nucleicos (TANG et al., 1997; ABUBAKAR et al., 2007; WAIN; HOSOGLU, 2008; JASSON et al., 2010).

2.5.1 Método Convencional

A detecção de *Salmonella* spp. em alimentos é uma análise que pode demorar de 4 a 7 dias quando é realizada pela metodologia convencional: ISO 6579 (BENNETT et al., 1998). Para a indústria de alimentos, que mantêm os seus produtos retidos na empresa até a liberação dos resultados analíticos, este tempo pode representar perdas econômicas, o que leva à busca de métodos alternativos analíticos mais rápidos com a mesma eficácia. Porém, métodos e meios estipulados devem ser sensíveis o suficiente para detectar um número extremamente reduzido de células (TIEJEN & FUNG; 1995).

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos fundamenta-se em quatro etapas, que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e a identificação completa das colônias através de testes bioquímicos e sorológicos (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 1997; BOER e BEUMER, 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2002; GIOMBELLI e LOPES DA SILVA, 2002).

A fase de pré-enriquecimento em caldo não seletivo, visa à recuperação de células injuriadas através da incubação à 34°C - 38°C, da amostra por um período de 18 a 20 horas. A etapa de enriquecimento em caldo seletivo objetiva inibir a flora acompanhante e proporcionar o crescimento da população de *Salmonella* spp. Recomenda-se a utilização de, no mínimo, dois tipos de caldos seletivos. A eficácia do isolamento do micro-organismo depende da interação entre os meios de enriquecimento seletivo, temperatura e tempo de incubação (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2007; FORTUNA e FRANCO, 2005 e ISO 6579 – 1, 2017).

O plaqueamento seletivo diferencial permite o desenvolvimento, principalmente, de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* spp., com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação bioquímica e sorológica. Os testes bioquímicos permitem analisar o perfil metabólico do micro-organismo pesquisado e a sorotipagem permite a caracterização antigênica, que é o passo definitivo e provê a identificação específica da cultura isolada (BAILEY, et al., 1991). A bactéria do gênero *Salmonella* pode ser identificada de acordo com seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi), tendo o esquema de Kauffmann-While como base (EVEREST et al., 2001).

Segundo Santos et al. (2001), o método convencional possui muitas etapas trabalhosas e demoradas, que exigem um grande número de reagentes e vidraria, principalmente se for

processado um grande número de amostras. Além disso, falsos negativos podem ocorrer devido à quantidade de bactérias presente na amostra ou se houver administração de antimicrobianos. Esse período demasiado longo pode comprometer as medidas de controle nas indústrias ou até mesmo a exportação de produtos e subprodutos cárneos.

2.5.2 Métodos alternativos / rápidos

2.5.2.1 Técnica imunoenzimática

Nas últimas décadas, vários métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. foram desenvolvidos, tais como ELISA, imunodifusão, hibridização do DNA, aglutinação em látex e imunofluorescência, porém, muitos desses métodos apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade, limitando a sua aceitação (BURKHATLER, 1996).

Dentre as técnicas imunológicas mais utilizadas em microbiologia dos alimentos, encontra-se a técnica imunoenzimática. O primeiro ensaio imunoenzimático (EIA) para *Salmonella* spp. foi descrito em 1977 devido à necessidade de diminuir o tempo para a obtenção dos resultados analíticos e aumentar a produtividade laboratorial (BEUMER, BRINKMAN e ROMBOOTS, 1991; FRANCO, 1999).

Segundo Franco (1991), os ensaios imunoenzimáticos (EIA) fundamentados em técnicas de triagem são muito empregados por apresentarem grandes vantagens como simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem.

As técnicas imunológicas embasadas nas reações antígeno-anticorpo fazem uso de anticorpos marcados com enzima cromogênica para facilitar a leitura pelos aparelhos automatizados. Diversos tipos de *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) foram desenvolvidos utilizando anticorpos policlonais e monoclonais capazes de detectar inúmeros sorotipos de *Salmonella* spp. associados às infecções humanas (BEUMER, BRINKMAN e ROMBOOTS, 1991; FRANCO, 1999; REIS, MAMIZUKA e FRANCO, 2001).

Os sistemas de rápida detecção de micro-organismo patogênicos multiparamétricos de imunoensaio, são, na maioria, miniaturizados, contendo pequenos volumes de meio de cultura podem ser também computadorizados e parcial ou totalmente automatizados. Além disso, apresentam vantagens evidentes em relação à simplicidade e facilidade na rotina laboratorial de análises. A desvantagem é que apesar do reconhecimento internacional, estes métodos quando utilizados na pesquisa de patógenos e outros micro-organismos presentes em alimentos e matérias primas, tais como a *Salmonella* spp., são considerados métodos de

triagem, na constatação de resultados positivos, torna-se necessária a confirmação pelos métodos convencionais.

De acordo com Forsythe (2002), existe uma ampla variedade de métodos ELISA disponíveis comercialmente, especialmente para *Salmonella* spp. Essa técnica geralmente requer que o organismo-alvo esteja em uma concentração de 10^6 UFC/mL, apesar de alguns testes relatarem um limite de sensibilidade de 10^4 .

O VIDAS SLM é um teste qualitativo automatizado, que permite a detecção de antígenos de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios e matérias primas, pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (SOARES, SOARES, 2013).

No VIDAS™, o cone de utilização única serve tanto de fase sólida quanto suporte de pipetagem para o teste. O interior do cone é revestido com anticorpos anti-*Salmonella* absorvidos na sua superfície. Os demais reagentes estão prontos para serem utilizados e pré-repartidos no barrete. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente pelo aparelho. Os antígenos se ligam aos anticorpos específicos, são lavados e em seguida, outros anticorpos ligados a uma enzima fluorescente (fosfatase alcalina) também se ligam ao antígeno formando um “sanduíche”. Em seguida, ocorrem novas lavagens do cone para retirar tudo que não está conjugado e no último poço, o equipamento faz a leitura através da intensidade da fluorescência emitida, que interpreta como positivo ou negativo para o antígeno em questão (AOAC, 2012).

2.5.2.2 Técnica PCR em tempo real

A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variante da PCR convencional e oferece a possibilidade de quantificar, de forma sensível, o número de patógenos em uma determinada amostra, através da quantificação do DNA bacteriano em tempo real, sem a necessidade da etapa de crescimento microbiano. Ou seja, o resultado pode ser expresso no mesmo dia. É uma técnica mais sensível e específica quando comparadas aos outros testes (KURKELA; BROWN, 2009).

Devido à sua rapidez e especificidade, a técnica de PCR tem se tornado uma das mais empregadas para a detecção de micro-organismos patogênicos. No entanto, algumas vezes, ela pode apresentar alguns problemas, como a inibição da amplificação do fragmento de DNA de interesse ou a amplificação de fragmentos incorretos, entre outros (BROWN, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se em duas propriedades de DNA: 1) as cadeias integrantes da dupla hélice do DNA separam-se sob o aumento de temperatura, processo este reversível; 2) a enzima de DNA polimerase é capaz de replicar *in vitro* uma sequência de DNA, desde que haja uma fita de DNA para servir de molde ou alvo, um pequeno trecho de fita capaz de iniciar o processo (“primer” ou oligonucleotídeos iniciadores complementares ao DNA alvo) e nucleotídeos livres (formadores da molécula de DNA), além de sais e tampões nas concentrações adequadas (PONTES, 1999).

A quantificação através da qPCR baseia-se no aumento exponencial da quantidade inicial de DNA durante os ciclos de amplificação da PCR. Para a quantificação absoluta de patógenos, há necessidade, inicialmente, de configurar uma curva padrão através de diluições seriadas de uma quantidade conhecida de um DNA alvo (MACKAY, 2007).

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

Segundo Mackay (2007) o Cycle Threshold (CT) é o ponto que detecta o ciclo no qual a fluorescência produzida pela reação encontra a linha Threshold. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível embasada na fluorescência e é proporcional a quantidade do produto da PCR.

3 REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, I.; IRVINR, L.; ALDUS, C.F.; WYATT, G.M.; FORDHAM, R.; SCHELENZ, S.; SHEPSTONE, L.; HOWE,A.; PECK, M.; HUNTER, P.R. A systema ticreview of the clinical, publicheal thand cost-effecti veness of rapiddia gnostictests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. **Health Technology Assessment**, v. 11, n. 36, 2007.

ALMEIDA, P. F.; SILVA, E. N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n. 2, p. 105-120, 1992.

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 190-194, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis: Microbiological methods. 2011.03 *Salmonella in a Variety of Foods*. 19 ed. Washington, 2012.

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

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

BARENDZ, A.W.: "Food safety and total quality management." **Food Control**, vol. 9, n. 2-3, 1998.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; MONTEIRO, A.A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 4, p. 856-862, 2007.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmonelose aviárias. In BERCHERI JÚNIOR, A.; ACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 185-195, 2000.

BHAGWAT, A.A. et al., Detection of *Salmonella* species in food stuffs. **Methods Biology**, 2008.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003. **Diário Oficial da União** de 10/10/2003, seção 1, p.9. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 22/02/2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2008 – Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em: 22/04/2019.

BROWN, T.A., **Molecular Biology** 2ed. Manchester: Academic Press, p. 255, 1998. (Gene Analysis; v. II).

BURKHATLER, P.W. et al, Detection of *Salmonellas* pp in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. **Journal of AOAC International**, v. 79, n.3, p.123, 1996.

BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n.4, p. 363-374, 1991.

BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of food borne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 119-130, 1999.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p 229 – 234, 2002.

CARDINALE, E.; TALL, F.; GUÈYE, E.F; CISSE, M.; SALVAT, G. Risk factors for *Salmonella* enteric subsp. Enteric infection in Senegalese broiler-chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.63, n. 9-4, p. 151-161, 2004.

CARDOSO, A.L.S.P.et al. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p, 144-150, 2005.

CARDOSO, A.L.S.P. & TESSARI, E. N.C., Divulgação técnica: *Salmonella* na segurança dos alimentos; **Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, 2008.

CARVALHO, L. T.; COSTA, P.S.; CARVALHO, A. L. T., Análises de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p.34-42, abr., 2002.

DAS, S. et al., Serotypic and antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* species isolated from cases of gastroenteritis at Infectious Diseases Hospital (IDH), Delhi from 1997-2000. **The Journal of Communicable Disease**. 34(4):237-244.2002.

DAVIES, R. H.; BRESLIN, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. **Journal of the British Veterinary Association**, Londres, v. 152, n. 10, p. 283-287, 2003.

DIKEL, E.L. et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Ciências Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

EVEREST, P. et al., The molecular mechanisms of severe typhoid fever. **Trends Microbiol.** 9(7):316-320.2001.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Recommended international code of practice general principles of food hygiene. Rev., v. 4, p. 1-31, 2003. Disponível em: <<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/guideline/dl/04.pdf>>. Acesso em: 22/02/2018.

FIGUEIREDO, V.F.; NETO, P.L.O.C. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. **Gestão de Produtos**. São Carlos, v.8, n. 1, 2001.

FORSHELL, L. P., WIERUP, M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p. 541-554, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v.33, n.2, p.229-234, jul/dez. 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 2004.

KURKELA, S.; BROWN, D. W. G. Molecular diagnostic techniques. **Medicine**, v. 37, n. 10, p. 535-540, 2009.

GARRICK, R.C.; SMITH, A.D. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in applied Microbiology**, v. 18, p. 187-189.1994.

GIOMBELLI, A.; LOPES DA SILVA, N. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carne in natura. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16. n.95, p.88-91, 2002.

GOUVÊA, R.; SANTOS, F. F.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M.; PEREIRA, V. L. A. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico do Saber, **Isolamento Bacteriológico e PCR na Detecção de *Salmonella* spp. em Peito de Frango de Estabelecimento Varejista**. Goiânia, v.8, n.15. p. 1129 – 1135.2012.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella serovars**. 9.ed. Paris: World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, p. 166, 2007.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th edition Philadelphia, USA: Lippincott Williams e Wilkins, p. 789, 2000.

HUMPHREY, T. Salmonella, stress responses and food safety. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 504-509, 2004.

ICMSF (2002) **Microorganisms in Foods 7**. Microbiological Testing in Food Safety Management. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA.

International Standard Organization. ISO 6579-1:2017, **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 2017.

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

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDALE, M. Alternative microbial methods: and verve wand selection criteria. **Food Microbiology**, v. 27, p. 710-730, 2010.

LELL, C.; BASSI, E. A. Produtos apícolas – qualidade total. In: **II Encontro de Apicultores e Meliponicultores do Sul da Bahia**, Editus: Ilhéus/BA. 1998.

Le MINOR, L. Genus III *Salmonella*. In: STALEY, J.T, BRYANT, M. P. eds. **BERGEY'S manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Wiliams na Wilkins, v.1, p.427-458. 1984.

NASCIMENTO, M.S.; BERCHIERI JR, A.; BARBOSA, M.D.; ZANCAN, F>T.; ALMEIDA, W.A.F. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de Salmonella em carcaça de frango e fezes de aves. **Revista Brasileira de Ciências Avícola**, Campinas, v. 2, n.1, p.85-91, 2000.

OLIVEIRA, S.D. **Detecção e Identificação de *Salmonella* sp., *Salmonella Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Cinco chaves para uma alimentação mais segura. Portugal, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf>. Acesso: 28/11/2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. *Salmonella* Resistente. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>Acesso: 28/11/2018.

PIRES, S.M.; VIGRE, H.; MAKELA, P.; HALD, T. Using out break data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis em Europe. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.11, n. 7, p. 1351-1361, 2010.

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

POPOFF, M.Y., MINOR LE. **Formule antigeniques des sérovars de *Salmonella***. Paris: Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherches pour les Salmonella, Institut Pasteur, p. 151, 1997.

POPPE, C. ***Salmonella* in Domestic Animals**. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl, Internationa, 2000.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E.M.; FRANCO, B.D.G.M.. Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 22 (2): 105-110, 2002.

ROSE, N.F.; BEAUDEAU, P.; CROUIN, J.; TOUX, V.R.; COLIN, P. Risk factors for Salmonella persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**. Amsterdam, v. 44, n.1-2, p. 9-20, 2000.

SALLES, M.A.F., SILVA, P.K.S., FONSECA, S., REIS, V., CARNEIRO, A.L., BRANCO, F.R., SILVA, P.L., CUNHA, A.P., Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 92, nº 92/93, p. 3640, 2002;

SILVA, E.N. *Salmonella Enteritidis* em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, p.9-12, 1998.

SILVA, N., JUNQUEIRA. V.A.C., SILVEIRA, F.A. Métodos de análises microbiológica de alimentos. Manual técnico ITAL n. 14, Campinas, p. 135- 141. 2007;

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

SOARES, V. R. e SOARES, C. R. S., **Verificação da sensibilidade e especificidade para detecção de *Salmonella* spp pelo MINI-VIDAS Biomérieux**, 2013. – Disponível em: <<http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/2/4.pdf>> Acesso: 20/05/2017.

SVS. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasil, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf> Acesso em 25/05/2018

TALAMINI, E.; PEDROZO, E.A.; SILVA, A.L. Gestão da cadeia de suprimentos e a segurança do alimento: uma pesquisa exploratória na cadeia exportadora de carne suína. **Gestão de Produtos**, São Carlos, v.12, n.1, p.107-120, 2005.

TANG, Y.; PROCOP, G.W.; PERSING, D.H. Molecular diagnostic of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v.43, p. 2021-2038, 1997.

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

WAIN, J.; HOSOGLU, S. The laboratory diagnosis of enteric fever. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, p. 421-425, 2008.

WRAY, C.e WRAY, A. ***Salmonella* in Domestic Animals**. Oxon, United Kingdom: CABI Publishing, p. 462, 2000.

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial e, conseqüentemente, da produção mundial de alimentos, a segurança dos alimentos se faz necessária com objetivos de diminuir a severidade e a quantidade de registros de doenças de origem alimentar causadas por micro-organismos e/ou suas toxinas.

A busca por alimentos de qualidade, livres de qualquer agente contaminante capaz de causar danos à saúde, seja este físico, químico ou biológico, mesmo com a aplicação das Boas Práticas de Fabricação e dos procedimentos Padrão de Higiene Operacional, bases da segurança da qualidade alimentar, se torna difícil na prática devido aos processos que possibilitam a sobrevivência de patógenos naturalmente presentes no alimento e no ambiente. (SALLES, et al., 2002).

A ocorrência de infecções alimentares representa um grande problema para a saúde pública, a *Salmonella* spp. é um dos principais micro-organismos causadores de doença de origem alimentar, vinculada principalmente a produtos avícolas, tendo ampla distribuição em todo mundo, estando associada a prejuízos econômicos, dificuldades comerciais e queda na produção (GOUVÊA et al., 2012),

Sabe-se que com o passar dos anos o consumo de carne de frango no mundo e no Brasil aumentaram significativamente. A necessidade de melhorar cada vez mais a qualidade e diminuir a ocorrência de patógenos presentes nos alimentos faz com que também haja a necessidade de melhoria da tecnologia quanto à detecção destes patógenos.

Nas últimas décadas, a indústria juntamente com o governo, vem trabalhando juntos na produção de alimentos de origem animal, para garantir a qualidade e segurança para o consumo humano, principalmente em relação a produtos avícolas.

O controle da *Salmonella* spp. na avicultura envolve medidas de prevenção não só na indústria, mas também no campo, onde se busca a redução da incidência da bactéria. Mas devemos ressaltar que as boas práticas no preparo de alimento pelos consumidores também são importantes para a prevenção da salmonelose. Durante o processamento da carne, pode ocorrer a contaminação do próprio ambiente e a partir dos manipuladores, bem como a contaminação cruzada por meio de outras aves contaminadas (SILVA, 1998).

Segundo Jay (2005), a salmonelose é causada pelo consumo de alimentos que contenham concentrações em torno de 10^7 a 10^9 células por grama e possui como sintomas característicos: náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreias, que surgem após 12 horas da ingestão dos alimentos contaminados, podendo persistir de dois a sete dias. Todavia, esta dose infectante pode ser menor, conforme a virulência do subtipo, tipo de alimento e estado imune do paciente (HUMPHREY, 2004).

Atualmente, um grande desafio para o controle das contaminações por microorganismos patogênicos é o seu diagnóstico rápido e preciso. A busca por uma metodologia adequada e eficaz para detectar *Salmonella* spp. em alimentos e matérias primas tem sido uma constante entre os pesquisadores da área (GIOMBELLI, 2000).

O método tradicional, International Standards Organization - ISO 6579 é bastante sensível, com limite de detecção de uma unidade formadora de colônia/25g de amostra, porém, é trabalhoso e lento, que demanda tempo e trabalho para chegar ao diagnóstico final, requerendo mais de cinco dias para confirmar um resultado positivo. O que limita a capacidade de análise dos laboratórios. A etapa mais cara, mais trabalhosa e mais demorada é a confirmação, porque envolve a caracterização sorológica e bioquímica de várias colônias, isoladas das placas de meios seletivos diferenciais. Além disso, a demora na obtenção de resultados pode comprometer as medidas de controle nas indústrias. Em função disso, há um grande interesse por métodos alternativos mais rápidos e mais simples, que possam ser utilizados em lugar do método convencional (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

O tempo transcorrido entre o início e o término da análise microbiológica gera necessidade de estocagem da produção (necessidade de frio, espaço físico, estrutura de logística de distribuição, etc.) o que proporciona custos adicionais de produção. Quanto maior for o tempo para liberação dos resultados, maior será o tempo para a tomada de ações corretivas e preventivas em casos de desvios da qualidade.

O tempo exigido para a liberação do diagnóstico microbiológico pelo método convencional é uma das principais razões para o aumento do uso de novas metodologias de triagem para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, que buscam respostas rápidas para a solução de possíveis problemas durante o processo de produção, o que proporciona maior qualidade para o consumidor, além da possibilidade de redução de custos para o produtor.

Nas últimas décadas, vários métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. foram desenvolvidos, tais como ELISA, imunodifusão, hibridização do DNA, aglutinação em látex e imunofluorescência, porém, muitos desses métodos apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade, limitando a sua aceitação (BURKHATLER, 1996).

Dentre as possíveis técnicas a serem empregadas, destacam-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e as técnicas imunológicas, como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (DICKEL et al, 2005).

Segundo Franco (1999), os ensaios imunoenzimáticos (EIA) fundamentados em técnicas de triagem são muito empregados por apresentarem grandes vantagens como simplicidade, rapidez, sensibilidade, especificidade e conveniência como método de triagem.

O VIDAS SLM é um teste qualitativo automatizado, que permite a detecção de antígenos de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios e matérias primas, pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (SOARES, SOARES, 2013).

A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variante da PCR convencional e oferece a possibilidade de quantificar, de forma sensível, o número de patógenos em uma determinada amostra, através da quantificação do DNA bacteriano em tempo real, sem a necessidade da etapa de crescimento microbiano. Ou seja, o resultado pode ser expresso no mesmo dia. É uma técnica mais sensível e específica quando comparadas aos outros testes (KURKELA; BROWN, 2009).

Devido à sua rapidez e especificidade, a técnica de PCR tem se tornado uma das mais empregadas para a detecção de micro-organismos patogênicos.

Diante do exposto, este estudo visa verificar a incidência de *Salmonella* spp. e comparar o desempenho do método convencional frente aos métodos alternativos na detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frango.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras examinadas

Para a detecção de *Salmonella* spp., foram analisadas 90 carcaças de frango, sendo 45 carcaças de frango “*in natura*” oriundas de três produtores com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e 45 carcaças de frango experimentalmente contaminadas com cepa padrão de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), para a realização deste estudo.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da IBERPHARM do Brasil, Machado / MG, para realização das análises pelos métodos ISO 6579 e VIDASTM e para o Laboratório Biologia Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas /MG, para a análise de PCR em tempo real.

As amostras escolhidas para a contaminação artificial foram do mesmo abatedouro que apresentou resultados negativos no teste anterior, quando se empregou o método convencional.

As amostras de carcaça de frango foram experimentalmente contaminadas com cepas padrão de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) a partir da fase logarítmica (FL) de crescimento em meio de cultivo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI). Diluições sucessivas foram realizadas a partir da BHI-FL (10°) até a diluição 10⁻⁹, sendo inoculado 1mL da diluição 10⁻⁸, em uma alíquota de 25 g da matriz juntamente com o pré enriquecimento, água peptonada 1% esterilizada, de modo a obter até 10 UFC/mL.

As análises foram realizadas paralelamente pelos métodos: convencional (ISO 6759-1) e alternativos: análise por imunofluorescência – método: VIDAS®-SLM e por reação em cadeia pela polimerase: PCR em tempo real. Para cada método analisado foi realizado um controle negativo e um controle positivo.

2.2 Detecção de *Salmonella* spp.

2.2.1 Diluição inicial ou pré-enriquecimento não seletivo

Para cada amostra, foram pesados 25 g, transferidos e homogeneizados em saco de *stomacher* contendo 225 mL de água peptonada a 1% esterilizada. A partir deste preparo inicial e após sua incubação a 37°C ± 2°C/ 18 a 20 horas, as análises foram realizadas conforme metodologias estudadas.

2.2.2 Método Convencional – ISO 6579

2.2.2.1 Enriquecimento seletivo para o isolamento de *Salmonella* spp.

Após o período de incubação do pré-enriquecimento para *Salmonella* spp., repicou-se 0,1 ml da amostra para tubos contendo 10 mL de caldo rappaport-vassiliadis, 1mL da amostra para tubos contendo 10 ml do caldo tetrionato/novobiocina. O caldo rappaport foi incubado em banho-maria à temperatura de $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas \pm 3 horas e o caldo tetrionato em estufa bacteriológica, à temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h \pm 3 h.

A partir de cada caldo de enriquecimento seletivo, estriou-se uma alçada em placas contendo Agar desoxicolato lisina xilose (XLD) e Agar verde brilhante vermelho de fenol – lactose e sacarose (BPLS), incubando as mesmas em estufa bacteriológica, a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h \pm 3h. As colônias típicas e atípicas foram submetidas às provas bioquímicas: Agar Lisina Descarboxilase (LIA), Agar tríplice açúcar ferro (TSI) e Agar Úreia e sorológicas – soro polivalente somático, flagelar(H) e VI.

2.2.3 Métodos alternativos ou rápidos

2.2.3.1 Técnica Imunofluorescência

Para a detecção de *Salmonella* spp. pelo o método imunoenzimático, foi utilizado o método VIDAS®, que permite a detecção de antígenos de *Salmonella* spp. pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) com o aparelho da família VIDAS®. O teste VIDAS® utiliza uma mistura de anticorpos de captura com grande especificidade, dirigidos contra antígenos O e H, permitindo a detecção de estirpes/cepas com e sem motilidades de *Salmonella* spp.

Para o ensaio de triagem com equipamento mini-VIDAS, as amostras foram acondicionadas em água peptonada 1%, e incubadas por 16-22 horas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Alíquotas de 1mL foram transferidas para 10 mL do caldo SX2 e incubadas em banho-maria, a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação, dois mL do caldo SX2 foram transferidos para tubos esterilizados e aquecidos em banho-maria, a 95 a 100°C , durante 15 minutos, em seguida resfriados a temperatura ambiente, homogeneizados e alíquotas de 0,5mL foram transferidas para os poços-amostra da barrete VIDAS® e analisadas no equipamento mini-VIDAS®, pelo Kit VIDAS®-SLM (Mini-VIDAS® , BIOMÉRIEUX), com resultados expressos por positivo ou negativo.

O tempo da corrida no Mini-VIDAS é de 45 minutos por amostra podendo ser analisadas 12 amostras simultaneamente. Se o resultado obtido for positivo, é necessário confirmar pelo método convencional ISO 6579.

2.2.3.2 Técnica molecular da reação em cadeia da polimerase - PCR em tempo real

Após o período de incubação do pré-enriquecimento para *Salmonella* spp., seis alíquotas de 1mL da água peptonada foram transferidas para tubos tipo eppendorf e mantidos sob temperatura de congelamento, -18°C, para posterior realização da análise de PCR.

O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Após as amostras secarem em temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspenso com água ultrapura + RNase. Os sobrenadantes contendo o DNA foram mantidos congelados à -20°C até a realização das análises.

Para a PCR em tempo real foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5`end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3`end, foi ligado um “quencher” NFQ (non-fluorescent quencher). O marcador e a sonda TaqMan utilizados estão apresentados no quadro 3.

Quadro 3 – Sequência dos indicadores utilizados na reação de amplificação de DNA.

Indicadores	nmoles*	Sequência
Sonda	0.5	5`-/56-FAM/TTACGACGA/ZEN/TATTCGTCCGGGTGAAGTC/3IABKFQ/-3'
Primer 1	1.0	5`-/GGTCTGCTGTACTCCACCTTCAG-3'
Primer 2	1.0	5`/TTGGAGATCAGTACGCCGTTCT-3'

*nmoles:

As reações foram realizadas em um *Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, em um volume final de 10µL por reação. Foi adicionado 1µL de uma mistura que inclui os marcadores forward, reverse, e a sonda TaqMan, marcada com FAM, utilizando NFQ como quencher na placa. Em seguida, foi preparado um mix contendo 5 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e e 3,5 µL de água livre de DNase e RNase e 1µL de DNA das amostras. Foi utilizado um controle negativo para cada reação. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa constou de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na etapa seguinte, foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

Está técnica tem sido muito empregada para triagem dentro da indústria de alimentos, pois têm-se resultados rápidos (2 dias), porém quando se obtêm resultados positivos é necessário a confirmação pelo método convencional.

2.2.4 Análise Estatística

Somente as amostras de carcaça de frango que apresentaram a presença de *Salmonella* spp. confirmada através da sorotipagem completa foram consideradas positivas. Aquelas amostras em que a *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhum dos três métodos foram consideradas negativas.

A análise estatística foi realizada de acordo com o teste não paramétrico de Mc Nemar (SIEGEL, S.; 1956), onde $X^2 = [(ND-PD)-1]^2 / (ND + PD)$, ($X^2 > 3,84$ é significativo ao nível de $p=0,05$) e conforme a ISO 16140, para amostras naturalmente contaminadas, item 5-Métodos Qualitativos, onde são definidos:

- A) Concordância relativa (RA): Grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas;
- B) Desvio Positivo (PD): O método alternativo se torna falso positivo quando mostra um desvio positivo se ele indica um resultado positivo quando o método convencional indica um resultado negativo;
- C) Desvio Negativo (ND): O método alternativo indica um desvio negativo se ele apresenta um resultado negativo quando o método de referência apresenta um resultado positivo;
- D) Sensibilidade Relativa (RS): Capacidade do método alternativo para detectar o alvo quando ele é detectado pelo método de referência;
- E) Especificidade relativa (RE): Capacidade do método alternativo de não detectar o alvo quando ele não está entre as proporções de resultados positivos confirmado e negativos detectado pelo método de referência.

O teste de x^2 de Mc Nemar com 5% nível de significância, foi utilizado para determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre as proporções de resultados positivos confirmados e negativos obtidos por cada um dos métodos utilizados com o método

convencional.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a comparação entre os métodos, considerou-se o conceito de método alternativo e método convencional ou de referência apresentados na ISO 16140:2003.

O método alternativo é aquele que demonstra como uma mesma amostra analisada se comporta ao utilizar-se o método convencional.

Neste estudo, o método convencional foi a ISO 6759 e como alternativos, foram utilizados: VIDAS®-SLM e PCR em tempo real. Para avaliar a precisão dos métodos analisados, foram calculados a repetitividade (medida de conformidade) e reprodutibilidade (medida de correspondência).

As amostras nas quais a presença de *Salmonella* spp. foi confirmada por meio da sorotipagem completa foram consideradas positivas. Já as amostras em que a *Salmonella* spp. não foi detectada por nenhum dos três métodos foram consideradas negativas.

Consideraram-se resultados falso negativo quando as amostras que apresentaram um resultado negativo por um dos métodos, mas positivo por pelo menos um dos outros dois métodos empregados. E resultado “presuntivo” aquele obtido antes da etapa de confirmação.

Para determinar se havia diferença significativa entre as proporções de resultados positivos confirmados e negativos obtidos por cada um dos métodos utilizados com o método convencional, foi utilizado o teste de χ^2 de McNemar com 5% de nível de significância.

As tabelas 1 e 2 demonstram os dados e o cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carcaça de frango naturalmente contaminadas.

Tabela 1 – Dados obtidos das análises de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de frango naturalmente contaminadas “in natura” em função dos métodos estudados.

Métodos		PA (++)	NA (--)	ND (+-)	PD (-+)	X ²	Total N	PA + NA
Referência	Alternativos							
ISO 6579	VIDAS	6	34	1	4	1,8	45	40
	PCR em tempo							
ISO 6579	real	6	37	1	1	0,5	45	43

Legenda:

PA – concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA – concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

ND – Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);
 PD - Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);
 X^2 – Teste de x^2 de McNemar com 5% de nível de significância
 N – Número total de amostras analisadas

Tabela 2 – Desempenho dos métodos estudados em função dos cálculos da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa para *Salmonella* spp em amostras de carcaças de frango naturalmente contaminadas “in natura”.

Métodos		Concordância Relativa - RA (%) 100 x (PA + NA) / N	N+ PA + ND	Sensibilidade Relativa - RS (%) 100 x PA / N+	N- NA + PD	Especificidade Relativa - RE (%) 100 x NA / N-
Referência	Alternativos					
ISO 6579	VIDAS	89	7	86	38	89
ISO 6579	PCR em tempo real	96	7	86	38	97

Legenda:

RA – Concordância Relativa

RS – Sensibilidade Relativa

RE – Especificidade Relativa

PA – Concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA – Concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

ND – Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);

PD - Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);

N – Número total de amostras analisadas

O método ISO 6579 detectou 7 amostras positivas e o VIDAS 10 amostras. Os métodos ISO 6579 e VIDAS detectaram 36 e 35 amostras negativas respectivamente.

O $X^2 = 1,8$ ($x^2 = 3,841$ ao nível de $p=0,05$) (Tabela 1) demonstra que não existe diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 89%, a especificidade relativa foi de 89% e a sensibilidade relativa de 86%. O método alternativo VIDAS apresentou uma taxa de Falso negativo de 14% (100 - sensibilidade relativa) e de Falso positivo de 11% (100 - especificidade relativa).

Tabela 3 – Teste de McNemar para os métodos ISO 6579 e VIDAS nas amostras de carcaças naturalmente contaminadas “in natura”.

	VIDAS positivo	VIDAS negativo	Total da linha
ISO 6579 - positivo	6	1	7
ISO 6579 - negativo	4	34	38
Total da coluna	10	35	45

Comparando o método convencional com o método de PCR em tempo real, detectaram-se 7 amostras positivas para *Salmonella* spp. nos dois métodos e 38 amostras negativas. Conforme a tabela 1, o X^2 é 0,5, indicando que as técnicas não são diferentes estatisticamente.

Verificou-se que a concordância relativa foi de 96%, a especificidade relativa foi de 97%, e 86% de sensibilidade relativa. O método de PCR em tempo real apresentou uma taxa de Falso negativo de 14% (100 - sensibilidade relativa) e de Falso positivo de 3% (100 - especificidade relativa).

Tabela 4: Teste de McNemar para os métodos ISO 6579 e PCR em tempo real nas amostras de carcaça naturalmente contaminadas (in natura)

	PCR em tempo real positivo	PCR em tempo real negativo	Total da linha
ISO 6579 - positivo	6	1	7
ISO 6579 - negativo	1	37	38
Total da coluna	7	38	45

Comparando os métodos alternativos observou-se que no método VIDAS detectou-se maior número de *Salmonella* spp. positivo, porém os dois testes comparados com o método convencional tiveram 6 testes concordantes para amostras positivas.

As tabelas 5 e 6 demonstram os dados e o cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa para *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de frango artificialmente contaminadas.

Tabela 5 – Dados obtidos das análises de *Salmonella* spp. em amostras de carcaça de frango experimentalmente contaminadas.

Métodos		PA	NA	ND	PD	X^2	Total N	PA + NA
Referência	Alternativos	(++)	(--)	(+-)	(-+)			
ISO 6579	VIDAS	30	5	3	7	0,9	45	35
ISO 6579	PCR em tempo real	30	2	7	6	0,0	45	32

Legenda:

PA – concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA – concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

ND – Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);

PD - Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);

X^2 – Teste de x^2 de McNemar com 5% de nível de significância

N – Número total de amostras analisadas

Tabela 6 – Desempenho dos métodos estudados em função do cálculo da concordância relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa para *Salmonella* spp em amostras de carcaças de frango experimentalmente contaminadas.

Referência	Métodos Alternativos	Concordância Relativa - RA (%)	N+ PA + ND	Sensibilidade Relativa - RS (%)	N- NA + PD	Especificidade Relativa - RE (%)
		100 x (PA + NA) / N		100 x PA / N+		100 x NA / N-
ISO 6579	VIDAS	78	33	91	12	42
ISO 6579	PCR em tempo real	71	37	81	8	25

Legenda:

RA – Concordância Relativa

RS – Sensibilidade Relativa

RE – Especificidade Relativa

PA – Concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+);

NA – Concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-);

ND – Desvio negativo: método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-);

PD - Desvio positivo: método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+);

N – Número total de amostras analisadas

De acordo com a tabela 6, observa-se que o valor da especificidade relativa – RE obteve resultados bem inferiores nas amostras experimentalmente contaminadas quanto comparadas com as amostras “in natura”.

O índice da sensibilidade relativa demonstra a habilidade do método alternativo em detectar o micro-organismo alvo na amostra quando este for detectado pelo método convencional e a especificidade relativa é a habilidade do método alternativo em não detectar o micro-organismo alvo na amostra quando este não for detectada pelo método convencional.

Nas amostras artificialmente contaminadas os valores obtidos de X^2 ($\chi^2 = 3,841$ ao nível de $p=0,05$) demonstram que não existe diferença estatística entre os métodos. A concordância relativa foi de 78 e 71%, a especificidade relativa foi de 91 e 81%, e 42 e 25% de sensibilidade relativa, para os métodos VIDAS e PRC em tempo real respectivamente. O método alternativo VIDAS apresentou uma taxa de Falso negativo de 9% (100 - sensibilidade relativa) e de Falso positivo de 58% (100 - especificidade relativa). A técnica de PCR em tempo real apresentou uma taxa de falso negativo de 19% (100 - sensibilidade relativa) e de Falso positivo de 75% (100 - especificidade relativa).

O elevado número de falso positivo para a técnica de PCR em tempo real demonstra que é necessário aliar outra metodologia para a confirmação do método, porém como teste de triagem para resultados negativos ele é considerado satisfatório e rápido.

Analisando as 45 amostras de carcaça de frango experimentalmente contaminadas com até 10UFC/mL, 37 (82%) apresentaram a presença de *Salmonella* spp. na metodologias ISO 6579 e 100% nas metodologias VIDAS®-SLM e PCR em tempo real, porém ao serem confirmadas pela técnica convencional, essa porcentagem diminuiu conforme apresentado na Tabela 7 .

Tabela 7 – Resultados obtidos na recuperação de *Salmonella* spp. através da Microbiologia Convencional (ISO 6579), VIDAS®-SLM e PCR em tempo em carcaças de frango contaminadas experimentalmente em Machado /MG, 2018.

Parâmetros	ISO 6579	VIDAS®-SLM	PCR em tempo real
Positivos	37	33	36
Porcentagens (%)	82%	73%	80%

Os resultados obtidos diferem do estudo realizado por Coelho (2012), no qual demonstrou baixa capacidade de recuperação do micro-organismo, abaixo de 60%, e inconsistência dos resultados para o método convencional na concentração de 10^8 UFC.

Froder (2008) estabeleceu, em estudo com fezes suínas experimentalmente contaminadas, que o limite de detecção de *Salmonella* spp. por meio do método convencional é 100UFC/g. O alto número de células de *Salmonella* spp. necessário para a obtenção de resultados positivos pode estar relacionado com grande número de competidores na matriz e dificuldade de distribuição do inóculo, diferente do estudo agora desenvolvido, que utilizou como matriz um produto com baixa carga microbiana devido as boas práticas de fabricação e a homogeneidade do inóculo, uma vez que este foi adicionado juntamente a amostra com o pré enriquecimento.

Comparando a viabilidade entre as três técnicas (PCR em tempo real, ELISA - VIDAS® SLM e microbiológico convencional), a técnica de ELISA foi a mais prática, em função da menor complexidade na realização dos procedimentos para sua execução.

Tapchaisri et al. (1999) realizaram detecção de *Salmonella* spp. através de microbiologia convencional, PCR e ELISA em amostras de alimentos de origem avícola e suínica. Entre as 200 amostras de aves e suínos analisadas, sendo 100 de cada, 7% e 20%, 7% e 23% e 9% e 33% foram positivas para *Salmonella* spp. pelo método microbiológico convencional, PCR e ELISA, respectivamente. Observa-se uma semelhança com os resultados obtidos neste estudo.

De Medici et al. (1998) e McMahon et al. (2004) indicaram grandes concordância entre ELISA e a metodologia convencional. Porém, Reiter et al.(2007) encontraram maior percentual de amostras positivas no ELISA do que na metodologia convencional.

Por outro lado, Uyttendaele et al. (2003), diferentemente de todos os estudos, ao avaliarem produtos de origem aviária, detectaram amostras positivas somente pela metodologia convencional. Essa divergência de resultados pode estar relacionada com a presença de *Salmonella* spp. abaixo do limite de detecção do método ELISA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) - VIDAS®-SLM (<90 ufc/mL), mas no limite de detecção do isolamento convencional (9 a <90 ufc/mL). Outra possível causa para essa diferença é que as células do micro-organismo podem ter sido danificadas pelo frio ou calor, ou que as etapas de enriquecimento não tenham conseguido recuperar as mesmas (UYTTENDAELE et al., 2003; FAKHR et al., 2006; JASSON et al., 2011).

Oktaç e Heperkan (2006) realizaram um estudo com produtos lácteos e batatas cozidas e não encontraram diferença significativa quando compararam o método ISO e o método VIDAS® SLM, sendo ainda, que o método VIDAS® SLM foi capaz de detectar baixos níveis de contaminação. Os autores concluíram que existem 95% de concordância entre os dois métodos.

SANTOS et al. (2001) afirmaram que o pré-enriquecimento em água peptonada a 1% combinado à extração de DNA por fenol clorofórmio potencializariam a detecção de *Salmonella* spp. em carnes experimentalmente contaminadas.

Segundo Floresta (2006), a observação de resultados negativos para o isolamento bacteriano pela metodologia convencional e, positivos para PCR em tempo real pode estar relacionada com o fato das bactérias entrarem em estado fisiológico denominado viável não cultivável (VNC), no qual as células mantêm atividades metabólicas, mas não são cultiváveis pelos métodos tradicionais.

Em estudos realizados por Fakhr et al.(2006); O'regan et al.(2008); Bohaychuk et al.(2007); Eyigor et al.(2010) resultados falsos positivos na técnica PCR foram observados em outros estudos.

A sensibilidade da técnica de PCR também pode ser afetada devido à presença de substâncias inibitórias bem como falsos positivos podem ocorrer, pois o método é baseado na amplificação de material genético, que pode ser de bactéria morta, não cultivável ou degradada (WILSON, 1997; UYTTENDAELE et al., 2003).

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

Segundo OIE (2011), a sensibilidade de uma metodologia é a proporção de positivos verdadeiros detectados por este método, ou seja, a proporção de amostras que contenham o micro-organismo alvo e que fornecem resultados positivos no método em questão.

No estudo ora apresentado, verificou-se que as três metodologias utilizadas obtiveram 100% de sensibilidade avaliando tanto as carcaças de frango *in natura* quanto às aquelas artificialmente contaminadas.

A especificidade de um método é determinada pela a proporção de resultados negativos verdadeiros detectados pelo mesmo. Para as amostras experimentalmente contaminadas, foram observada 92% de especificidade nas metodologias ISO 6579 e VIDAS®-SLM de 87% para PCR em tempo real. Segundo Albano (2009), um teste específico oferece pouco risco de fornecer resultados falsos positivos.

Durante a realização do estudo, foi possível perceber vantagens e desvantagens em cada um dos métodos utilizados. A metodologia convencional, ISO 6579, apesar da sensibilidade e especificidade do diagnóstico, é uma técnica trabalhosa que requer de 5 a 7 dias para liberação dos resultados. Já os métodos alternativos VIDAS®-SLM e PCR em tempo real, apesar de serem considerados como triagem, necessitam apenas de 3 dias para serem concluídos.

A metodologia VIDAS®-SLM é um método automatizado e simplificado, que possui aprovação para vários tipos de matrizes, representa uma metodologia confiável e consolidada na detecção de *Salmonella* spp. na área de alimentos. A principal vantagem do método é a rapidez e praticidade na obtenção do diagnóstico, o que diminui os custos das indústrias avícolas, relacionados com a estocagem. Pode-se destacar ainda, a padronização das etapas e reagentes, além de ter os dados interpretados pelo software do equipamento que fornece os resultados como positivos e negativos, e a capacidade de analisar simultaneamente 24 amostras.

A metodologia de PCR em tempo real permite ao mesmo tempo detectar e quantificar a presença de *Samonella* spp. Segundo Maldonado (2008), o método PCR em tempo real apresenta como vantagens à agilidade, elevada sensibilidade, capacidade da análise simultaneamente de um grande número de amostras e o curto tempo de ensaio, podendo ser

utilizada pelas indústrias no rastreamento de patógenos presentes em todas as etapas e elos da cadeia, como forma de estabelecer controle e minimizar riscos pela exposição ao patógeno à saúde pública.

Como desvantagem dos métodos alternativos, podemos relatar o fato de serem considerados somente como triagem, ou seja, os resultados positivos devem ser confirmados pela metodologia convencional. E muitas vezes, dependendo da concentração do micro-organismo no meio, este não é isolado e confirmado pela a técnica convencional.

Os resultados alcançados demonstraram que, comparado ao microbiológico convencional, tanto o ELISA quanto o PCR foram eficazes na detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de carcaça de frango. Devido à praticidade na realização do ELISA, recomenda-se a utilização dessa técnica como teste de triagem para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de frango, visto que auxilia para uma determinação mais rápida das amostras negativas. A metodologia de PCR em tempo real apesar de ser uma tecnologia avançada ainda é pouco divulgada nos Laboratórios de Controle de Qualidade devido ao elevado custo.

4 CONCLUSÃO

O desempenho dos três métodos (ISO 6579, VIDAS e PCR em tempo real) para detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frango naturalmente e experimentalmente contaminadas não demonstrou resultados estatisticamente significantes ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Mc Nemar.

Os métodos alternativos por serem mais rápidos na liberação de resultados negativos, são considerados uma boa escolha para as indústrias de alimentos como métodos de triagem, pois permitem a rápida liberação de lotes com a devida segurança microbiológica monitorada, além de reduzir custos em relação ao armazenamento dos produtos.

Para os laboratórios credenciados juntamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, responsáveis por assegurar a qualidade dos produtos de origem animal, os métodos alternativos facilitam a liberação de resultados em menor tempo, especialmente nos casos negativos; porém implicam em maior custo, pois eles são considerados apenas métodos de triagem, pois nos casos positivos, há necessidade de confirmação pelo método convencional.

Devido à praticidade e custo na realização do ELISA, recomenda-se a utilização dessa técnica como teste de triagem para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carcaça de frango, visto que a mesma permite a identificação mais rápida das amostras negativas.

5 REFERÊNCIAS

- BOHAYCHUK, V.M.; GENSLER, G.E.; McFALL, M.E.; KING, R.K.; RENTER, D.G. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. **Journal of Food Protection**. v.70, n.5, p.1080-1087, 2007.
- BURKHATLER, P.W. et al, Detection of *Salmonellas* pp in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. **Journal of AOAC International**, v. 79, n.3, p.123, 1996.
- DE MEDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C.; CACIOLO, D.; FOSCHI, G.; OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. v.45, n.3, p.205-210, 1998.
- DIKEL, E.L. et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Ciências Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.
- EYIGOR, A.; TEMELLI, S.; CARLI, K.T. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM methods to complement real-time polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry meat and red meat. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.7, n.8, p.921-927, 2010.
- FAKHR, M.K.; MCEVOY, J.M.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. **Letters in Applied Microbiology**. v.43, n.1, p.78-83, 2006.
- FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado Viável não Cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, p.72, 2006.
- FORSHELL, L. P., WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p. 541-554, 2006.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p.182, 2004.
- FRODER, H. **Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de *Salmonella* sp. Por PCR-tempo real e por transcriptase reversa –PCR-tempo real**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 155. 2008.
- KURKELA, S.; BROWN, D. W. G. Molecular diagnostic techniques. **Medicine**, v. 37, n. 10, p. 535-540, 2009.

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

GOUVÊA, R.; SANTOS, F. F.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M.; PEREIRA, V. L. A. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico do Saber, **Isolamento Bacteriológico e PCR na Detecção de *Salmonella* spp. em Peito de Frango de Estabelecimento Varejista**. Goiânia, v.8, n.15. p. 1129 – 1135.2012.

HUMPHREY, T. Salmonella, stress responses and food safety. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 504-509, 2004.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 6579-1:2017, **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 2017.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, ISO 16140:2003, **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods**, 2003.

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

JASSON, V.; BAERT, L.; UYTENDAELE, M. Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella* enterica in chocolate. **International Journal of Food Microbiology**. v.145, n.2-3, p.488-491, 2011.

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

McMAHON, W.A.; SCHULTZ, A.M.; JOHNSON, R.L. Evaluation of VIDAS *Salmonella* (SLM) immunoassay method with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.87, n.4, p.867-883, 2004.

OKTAY, Hatice I.; HEPERKAN, Dilek. Evaluation of ISO method and VIDAS automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 133 - 145, 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/AGR/IND43812599>>. Acesso em: 05/12/18.

OIE - WORD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.5 – Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry**. 2011. Disponível em: < http://web.oie.int/eng/nomes/mcode/en_chapitre_1.6.5.pdf.> Acesso em 08/12/18

O'REGAN, E.; McCABE, E.; BURGESS, C.; McGUINNESS, S.; BARRY, T.; DUFFY, G.; WHYTE, P.; FANNING, S. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**. v.8, n.156, p.1-11, 2008.

SALLES, M.A.F., SILVA, P.K.S., FONSECA, S., REIS, V., CARNEIRO, A.L., BRANCO, F.R., SILVA, P.L., CUNHA, A.P., Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 92, nº 92/93, p. 3640, 2002;

SILVA, E.N. *Salmonella Enteritidis* em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, p.9-12, 1998.

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

SOARES, V. R. e SOARES, C. R. S., **Verificação da sensibilidade e especificidade para detecção de *Salmonella* spp pelo MINI-VIDAS Biomérieux**, 2013. – Disponível em: <<http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/2/4.pdf>> Acesso: 20/05/2017.

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

TAPCHAISRI, P.; WANGROONGSARB, P.; PANBANGRED, W.; KALAMBAHETI, T.; CHONGSA-NGUAN, M.; SRIMANOTE, P.; KURAZONO, H.; HAYASHI, H.; CHAICUMPA W. Detection of *Salmonella* contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**. v.17, n.1, p.41-51, 1999.

UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**. v.37, n.5, p.386391, 2003

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n.10, p.3741-3751, 1997.