

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FELIPE GAVA**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ELFA ELISA UTILIZANDO  
BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE E OUTROS MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM  
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**LAGES-SC**

**2012**

**FELIPE GAVA**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ELFA ELISA UTILIZANDO BACTERIÓFAGO  
RECOMBINANTE E OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE  
Salmonella spp. EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Eliana Knackfuss Vaz

**LAGES, SC**

**2012**

**FELIPE GAVA**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ELFA ELISA UTILIZANDO BACTERIÓFAGO  
RECOMBINANTE E OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE  
Salmonella spp. EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

Orientador(a): \_\_\_\_\_

Professora Dr<sup>a</sup>. Eliana Knackfuss Vaz, Orientadora  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: \_\_\_\_\_

Dr. Denis Augusto Spricigo  
Universitat Autònoma de Barcelona - UAB

Membro: \_\_\_\_\_

Professor Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Ferraz  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

**Lages, SC, 27 de julho de 2012**

## **AGRADECIMENTOS**

É imprescindível manifestar, através da dissertação, meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram na realização deste trabalho, em especial:

Á Deus, por iluminar meus caminhos e me dar força nos momentos em que enfraqueci.

A minha orientadora, Professora Dra. Eliana Knackfuss Vaz, não só pela oportunidade de desenvolver o projeto de mestrado sob sua orientação, mas também pela paciência, apoio, dedicação e confiança em mim depositada.

A minha família, Aldo, Roza, Danielle e Fernando, bem como ao Eduardo e Aline, por todo amor, conselhos, motivação e por me fazerem acreditar que realmente sou capaz.

A Paula, minha namorada, pelo companheirismo, amor, carinho, compreensão e extrema paciência em todas as horas.

Aos meus grandes amigos Daniel e Fabio, pela parceria de sempre, amizade e bons conselhos até nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. André Thaler Neto, que mesmo atarefado com aulas, viagens, palestras, sempre esteve disposto a ajudar.

A toda a equipe do CEDIMA, professores, bolsistas e estagiários, em especial à Fran, Fernanda, Marcio, Dayane, Gabriele, Mariana, Juliana e Paula. Fomos presenteadas pela convivência e amizade construída. Momentos alegres e descontraídos com vocês é que tornou tudo mais feliz.

A empresa BRF - unidade de Capinzal, por ceder o laboratório e amostras de material para análise, em especial aos colegas Roberto, Régis e Willian, sem a ajuda de vocês este trabalho teria sido muito mais difícil.

A empresa Biomerieux, por todo apoio técnico e financeiro para realização do trabalho.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC, que proporcionou minha formação como Médico Veterinário e agora, mais uma vez, contribuiu para meu aperfeiçoamento.

Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADO a todos vocês!!!

São fúteis e cheias de erros as ciências  
que não nasceram da experimentação,  
mãe de todo conhecimento.

(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

As análises para detecção de *Salmonella* spp. são de grande importância no processo da agroindústria de produtos de origem animal, pois refletem diretamente na qualidade microbiológica dos alimentos, impactando no tempo de estocagem e por conseguinte na liberação do produto para venda. O presente trabalho verificou a eficiência de um novo teste ELFA ELISA utilizando proteína recombinante oriunda de bacteriófago (VIDAS UP®) para detectar a presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal. Foram analisadas 215 amostras (15 amostras artificialmente contaminadas e 200 amostras de rotina da agroindústria), de diferentes produtos de origem animal. As amostras foram submetidas a cinco métodos de diagnóstico: ELFA ELISA, metodologia convencional de acordo com ISO 6579, reação em cadeia da polimerase - PCR, meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado - MSR/V e meio MSR/V + suplemento. Onze amostras das 215 (5,12%) foram positivas em pelo menos um dos testes, sendo quatro amostras de rotina da agroindústria e sete amostras artificialmente contaminadas. A sensibilidade e especificidade do teste ELFA ELISA com a metodologia convencional foi de 90,0% e 99,51%, respectivamente. O teste ELFA ELISA apresentou equivalência com as demais metodologias, mostrando ser eficaz e rápido na detecção de *Salmonella* spp. em diferentes produtos de origem animal.

**Palavras-chave:** Alimentos, *Salmonella* spp., diagnóstico, ELFA ELISA, bacteriófago.

## ABSTRACT

The analyzes for *Salmonella* spp. detection are of great importance in the process of agribusiness from products of animal origin, because they reflect directly on the microbiological quality of food, impacting the storage time and therefore the release of the product for sale. The present study verified the efficiency of a new ELFA ELISA test using a recombinant protein from bacteriophage (VIDAS UP<sup>®</sup>) to detect the presence of *Salmonella* spp. in products of animal origin. Two hundred fifteen samples (15 samples artificially contaminated and 200 samples from agribusiness routine), from different products of animal origin were analyzed. The samples were tested by five methods of diagnosis: ELFA ELISA, conventional methodology in accordance with ISO 6579, polymerase chain reaction - PCR, semi-solid Rappaport-Vassiliadis Modified - MSR/V and MSR/V medium + supplement. Eleven out of 215 (5.12%) samples were positive in at least one test, which four samples were from agribusiness routine and seven were from artificially contaminated samples. The sensitivity and specificity of the ELFA ELISA when compared with the conventional method was 90.0% and 99.51% respectively. The ELFA ELISA was equivalent to the other methodologies, showing to be effective and rapid to detect *Salmonella* spp. in different products of animal origin.

**Key words:** Food, *Salmonella* spp., diagnostic, ELFA ELISA, bacteriophage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Determinação da sensibilidade e especificidade das metodologias VIDAS UP <sup>®</sup> , PCR, e MSRV + Suplemento em comparação com a metodologia convencional.....	35
--	----



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Produtos de origem animal e do processamento da agroindústria, testados para *Salmonella* spp. por metodologia convencional, VIDAS UP<sup>®</sup>, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento.....33
- Tabela 2- Amostras positivas para *Salmonella* spp. testadas na metodologia convencional, VIDAS UP<sup>®</sup>, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento.....34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 TOXINFECÇÕES POR <i>Salmonella</i> spp.</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 <i>Salmonella</i> spp.</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.1 Características gerais</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.2 A infecção em humanos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.3 Métodos de diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp. em alimentos</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.3.1 Metodologia convencional</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.3.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV)</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.3.4 ELISA e ELFA ELISA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.3.4.1 ELFA ELISA com a tecnologia do bacteriófago</b> .....	<b>21</b>
<b>3 ARTIGO</b> .....	<b>24</b>
<b>Análise comparativa entre ELFA ELISA utilizando bacteriófago recombinante e outros métodos diagnósticos para detecção de <i>Salmonella</i> spp. em produtos de origem animal</b> .....	<b>25</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>25</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.1 Amostragem</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.2 Análises laboratoriais</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.2.1 Metodologia convencional de acordo com ISO 6579</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.2.2 ELFA ELISA com bacteriófago recombinante</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.2.3 MSRV e MSRV + suplemento</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.3.4 PCR</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.3 Análise estatística</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>31</b>
<b>4. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos representam um importante problema de saúde pública. O grande número de agentes causais aumenta significativamente as possibilidades de ocorrência das infecções alimentares. A contaminação dos alimentos, especialmente os alimentos de origem animal, causada por microrganismos patogênicos é considerada um problema para as indústrias de alimentos e um risco para o consumidor, devido a sua elevada frequência e gravidade (SHINOHARA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010).

Dentre os agentes causais, destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella*, que são responsáveis por muitos casos de toxinfecções alimentares (WEGENER e BAGER, 1997). Segundo Shinohara et al. (2008), a salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, exteriorizando-se pela suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medidas no seu controle.

O processamento e a manipulação de produtos de origem animal pelas agroindústrias representam um ponto importante de contaminação de carcaças e produtos alimentícios por *Salmonella* spp. (BARROS et al., 2007). Dentre eles, os produtos derivados de carne bovina, suína e de aves, podem ser considerados uma ameaça à saúde pública quando apresentam contaminação, preocupando os órgãos de fiscalização.

Desta forma, faz-se necessário a existência de métodos de detecção rápida para *Salmonella* spp. nestes alimentos antes que os mesmos cheguem ao comércio e à mesa do consumidor. A metodologia convencional de isolamento é o único método de detecção manual de *Salmonella* spp. atualmente reconhecido pelos órgãos oficiais do Brasil (BRASIL, 2003), no entanto, este método além de ser demasiadamente trabalhoso, requer mais de cinco dias para emitir o diagnóstico final. Este longo tempo pode comprometer as medidas de controle em frigoríficos ou até mesmo a exportação de produtos e subprodutos cárneos (SANTOS et al., 2001).

Assim, novas técnicas de diagnóstico de *Salmonella* spp. vem sendo estudadas e avaliadas em relação a especificidade e sensibilidade, para que, mediante comprovação, possam ser uma alternativa à metodologia convencional, evitando assim, seus inconvenientes. Dentre os testes alternativos existentes disponíveis no mercado que melhor se adaptam à rotina dos laboratórios de

alimentos destacam-se o PCR, MSR/V e ELFA-ELISA (FLOWERS et al., 1989; BEUMER et al., 1991; FRANCHIN et al., 2006; SOUSA et al., 2007; PÉREZ et al., 2008).

O ELFA-ELISA disponível comercialmente utiliza anticorpos monoclonais para a ligação com o antígeno em questão (FLOWERS et al., 1989). Com o objetivo de inovar os kits que utilizam esta tecnologia, foi desenvolvido um novo teste nos mesmos moldes do ELFA-ELISA, porém utilizando a tecnologia de proteínas recombinantes derivadas de um bacteriófago para ligação de anticorpos. As vantagens deste novo método envolvem o fato de apresentar maior praticidade na realização da técnica, pois esta é mais rápida e simples que a anterior, além de sugerir maior especificidade e sensibilidade.

Esse trabalho tem como objetivo avaliar esta nova metodologia quanto a sua praticidade e eficiência frente aos métodos já consagrados de detecção em laboratórios de alimentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TOXINFECÇÕES POR *Salmonella* spp.

As toxinfecções alimentares representam ainda hoje um sério problema de saúde pública, apesar de terem ocorrido mudanças no perfil epidemiológico das enfermidades transmitidas por alimentos. Mesmo com a expansão dos mercados de consumo, a globalização econômica, a alterações dos hábitos alimentares e o aumento no consumo de alimentos industrializados; as doenças veiculadas por alimentos continuam sendo uma das principais causas de elevada morbidade e mortalidade. Diversos patógenos alimentares são conhecidos por causarem doenças, estando veiculados a alimentos e água, e entre esses se sabe que as bactérias constituem um grande grupo de microrganismos causadores de enfermidades (SHINOHARA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010).

As condições higiênicas dos locais de produção e manipulação dos alimentos interferem na qualidade microbiológica de carne e derivados. A contaminação microbiológica das carcaças ocorre principalmente durante o processamento e manipulação, bem como na retirada da pele, evisceração, estocagem em frigoríficos e estabelecimentos de varejo (BARROS et al., 2007). Atualmente, a produção de alimentos seguros envolve uma discussão complexa de âmbito internacional, abrangendo agendas de pesquisa, operacionalização de programas de controle, rastreabilidade e certificação que permeiam todas as etapas da cadeia produtiva.

Entre os microrganismos importantes para a segurança alimentar, a *Salmonella* spp. tem se destacado como causadora de toxinfecções alimentares (WEGENER e BAGER, 1997). As Salmonellas se difundem amplamente na natureza, podendo estar presente no solo, ar, água, em águas residuais, nos animais, humanos, alimentos, fezes, dentre outros. Entretanto, seu habitat natural é o trato intestinal dos humanos e animais (WRAY e WRAY, 2000).

Diferentes produtos alimentícios podem estar contaminados com *Salmonella* spp., como os produtos cárneos e derivados de origem avícola e suína. Existem sorovares que estão adaptados a um hospedeiro específico (*Thypi* para humanos, *Choleraesuis* para suínos e o *Dublin* para bovinos), enquanto outros sorovares afetam um grande número de hospedeiros, desenvolvendo papel importante na disseminação da infecção entre diferentes espécies (WRAY e WRAY, 2000;

GRIFFITH et al., 2006). Embora *Salmonella enteritidis* e *Salmonella thyphimurium* sejam os sorotipos mais relacionados com infecções em humanos, todos os sorovares isolados de suínos são considerados um perigo de saúde pública (GEIMBA et al., 2004; BOYEN et al., 2008).

As aves são um importante reservatório de *Salmonella* spp., por isto, prevenir a transmissão pelos alimentos para humanos é prioridade nas granjas avícolas (WRAY e WRAY, 2000). Segundo Pérez et al. (2008), dos sorovares que podem infectar aves e ovos, a *S. enteritidis* é uma das mais importantes devido a alta difusão entre os animais e sua patogenicidade para humanos. Já na produção de suínos, esta infecção caracteriza-se por dois problemas: a presença de sorovares patogênicos que provocam gastroenterites e septicemias e a presença de sorovares que não causam doença nos animais, mas são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros e que podem infectar humanos (BESSA et al., 2004).

O sorovar predominante causador de infecções alimentares mudou nas últimas décadas de *S. agona*, *S. hadar* e *S. typhimurium* para *S. enteritidis*, sendo a *S. enteritidis* a causa predominante de salmoneloses em diversos países (PERESI et al., 1998; WHO, 2007). Alterações nos sorovares refletem mudanças na criação do animal e a disseminação de novos sorovares devido ao grande fluxo do comércio mundial (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

A ocorrência mundial de enfermidades veiculadas por alimentos não é de fácil estimativa. Mesmo assim, no ano de 2005 cerca de 1,8 milhões de pessoas morreram por doenças diarreicas, e na maioria dos casos a causa foi atribuída à água e alimentos contaminados (WHO, 2007). Considerando que grande parte dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, a ocorrência das salmoneloses na população humana transmitida por alimentos é provavelmente subestimada (SANTOS et al., 2002; WHO, 2007; SHINOHARA et al., 2008).

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, exteriorizando-se pelas suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle. Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose na população humana, o controle desta doença é de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem esses surtos.

## 2.2 *Salmonella* spp.

### 2.2.1 Características gerais

O gênero *Samonella* spp., pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram negativo, com metabolismo tanto respiratório como fermentativo e produtores de ácido sulfídrico (HOLT et al., 1994). São, na sua maioria, móveis, não esporulados, não capsulados, e não fermentadores de lactose (WRAY e WRAY, 2000). São capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono, não hidrolisam uréia e são indol negativas. A temperatura ótima para crescimento é 37°C, mas pode desenvolver-se numa faixa de temperatura de crescimento entre 7°C e 45°C, com pH de crescimento variando de 4 a 9, com ótimo em 7 (HOLT et al., 1994; WRAY e WRAY, 2000; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Samonella* spp foi descrito em 1886, por Daniel Elmer Salmon e Smith (GRIFFITH et al., 2006). A classificação do gênero *Salmonella* spp. está em constante mudança, contudo se baseia em características bioquímicas, dividindo o gênero em duas espécies: *Salmonella enterica* que está subdividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), e a *Salmonella bongori* (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Na rotina laboratorial, utiliza-se o esquema de identificação Kauffmann-White, que divide os gêneros em sorovares, baseando-se na composição antigênica em relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (D'AOUST, 1994). No total, existem 2610 diferentes sorovares de *Salmonella*, sendo que 1547 são pertencentes ao grupo *S. enterica* subsp. *Enterica*, justamente o grupo com maior potencial zoonótico (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

### 2.2.2 A infecção em humanos

A salmonelose é uma enfermidade que se caracteriza por sinais clínicos agudos, como náuseas, dor abdominal, diarreia, febre e dor de cabeça, mas que dependem do sorovar envolvido (SAPHRA e WINTER, 1957; WHO, 2007) A grande maioria dos sorovares de *Salmonella* é patogênica para o homem e a dose infectante depende do sorovar isolado, oscilando entre 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> unidades

formadoras de colônia (UFC). Todavia, esta dose infectante pode ser mais baixa, conforme a virulência do subtipo, tipo de alimento, idade e estado imune do paciente (HUMPHREY, 2004). Quando a bactéria estiver associada a alimentos com elevado teor de gordura, devido à proteção da ação dos ácidos gástricos, doses de até 10 células já podem ocasionar sinais clínicos (MOLBACK et al., 2006).

A febre tifóide é causada por *S. typhi*, acomete apenas humanos e não possui reservatórios em animais. Os sinais clínicos são muito graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômito. Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de infecção. O período de incubação usualmente varia de 7 a 21 dias e a duração da doença pode chegar a oito semanas (SAPHRA e WINTER, 1957; SHINOHARA et al., 2008).

Já a febre entérica é causada pela *S. paratyphi* A, B e C, e os sinais clínicos são mais brandos que em relação à febre tifóide, podendo evoluir para septicemia e frequentemente desenvolver um quadro de gastroenterite, febre e vômito. O período de incubação é usualmente de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de três semanas (SAPHRA e WINTER, 1957; SHINOHARA et al., 2008).

As infecções entéricas por sua vez, em decorrência de outras salmonelas, desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sinais clínicos dor abdominal, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos fatais. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas, podendo durar até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* spp. e o episódio geralmente sofre resolução em dois a três dias, não necessitando de uso de antibióticos (SAPHRA e WINTER, 1957; SHINOHARA et al., 2008).

### **2.2.3 Métodos de diagnóstico de *Salmonella* spp. em alimentos**

Para que se possa evitar a ingestão de produtos de origem animal contaminados, a detecção de *Salmonella* spp. nos alimentos antes da chegada ao consumidor é de extrema importância. O Brasil, como grande exportador mundial de carne bovina, suína e de aves, deve estabelecer medidas sanitárias de controle cada vez mais rígidas, evitando assim grandes prejuízos devido às perdas indiretas, através de embargos econômicos impostos pelos países importadores.



SANTOS et al. (2000) ao avaliarem carcaças de frangos congeladas, onde é esperada a redução de células bacterianas viáveis, observaram prevalência de 32% de *Salmonella* spp.. Por sua vez, a prevalência de *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal de suínos no estado do Rio Grande do Sul foi de 55,6% (BESSA et al., 2004). Em um estudo realizado na região Sul do Brasil em três diferentes empresas, a frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos variou de 62,5% a 85% enquanto a soroprevalência variou entre 73,8% a 83,2% (SCHWARZ et al., 2009). No estado de São Paulo, Teixeira (2006) confirmou o isolamento bacteriano em 23,9% das amostras de fezes, carcaças e linfonodos. Silva et al. (2009) encontraram 11,5% das amostras de tonsila e 19,4% das amostras de linfonodo mesentérico positivas para *Salmonella* spp. no estado do Mato Grosso.

Na década de 90, lançando mão de ferramentas de rastreabilidade, foi comprovada a associação entre a ingestão de carne suína e surtos de salmonelose humana na Europa e, a partir de então, foram estabelecidos programas específicos de controle em vários países (WEGENER e BAGGENSEN, 1996; WHO, 2007). Em decorrência disso, é necessário implantar programas de controle de *Salmonella* spp. em rebanhos, bem como em pontos críticos da produção e do processamento dos alimentos de origem suína além de outros produtos de origem animal (CARLSON e BLAHA 1998; LETELLIER et al., 2009). Para isso, são necessários testes confiáveis e eficientes que possam ser validados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), mediante comprovação de sua sensibilidade e especificidade.

No Brasil, existe uma legislação referente à qualidade microbiológica dos alimentos, onde esse agente deve estar ausente nos diferentes tipos de alimentos testados (BRASIL, 2003). Metodologias de prevenção a campo e dentro de frigoríficos são aplicadas, entretanto, mesmo com diversas medidas tomadas, o risco de toxinfecções alimentares não é eliminado totalmente para o consumidor (BRYAN, 1981; DUGUID e NORTH, 1991).

### **2.2.3.1 Metodologia convencional**

O controle da contaminação de alimentos por *Salmonella* spp. tem na atualidade o grande desafio no diagnóstico rápido e preciso. Para pesquisa deste microrganismo em alimentos, o método recomendado pelo *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), *American Public Health Association* (APHA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e MAPA é o método clássico de cultivo, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção desta bactéria, mesmo em alimentos que apresentem situações extremamente desfavoráveis para o seu crescimento (WRAY e WRAY, 2000; WHO, 2007).

A metodologia convencional utiliza para o diagnóstico: isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica. Para a identificação final da presença de *Salmonella* spp. as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meio sólido, plaqueamento em meio de cultura seletivo, identificação bioquímica e sorologia são necessárias (WRAY e WRAY, 2000). Esse método tem como objetivo a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos com microbiota competitiva ou quando as células se encontram em número reduzido ou injuriadas pelos processos industriais como o calor, congelamento, secagem, salga e cura (SOUSA et al., 2007).

O pré-enriquecimento objetiva recuperar as células de *Salmonella* spp. que, normalmente, estão presentes em pequenas quantidades e em condições debilitadas nos alimentos processados. O enriquecimento em caldo seletivo inibe a multiplicação da microbiota acompanhante e promove a elevação preferencial do número de células de *Salmonella* spp, incubando-se a amostra pré-enriquecida em caldo seletivo por 18 a 24 horas (WRAY e WRAY, 2000). Nesta etapa, recomenda-se a utilização de dois diferentes meios, pois a resistência da *Salmonella* spp. aos agentes seletivos varia de cepa para cepa. Os caldos tetrionato, Rappaport-Vasiliadis e selenito-cistina são meios mais utilizados (BUSSE, 1995).

O plaqueamento seletivo diferencial visa promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* spp., com características típicas que as distingam dos competidores. Os ágares indicados pelo MAPA são o ágar Hektoen, Rambach, MacConkey, verde brilhante suplementado com novabiocina (BGA), e o XLT4 (LOGUERCIO et al., 2002; BRASIL, 2003).

Os testes bioquímicos utilizados apresentam características que permitem observar a mudança de pH e alteração de coloração dos meios de cultura, quando houver crescimento bacteriano. O meio sulfeto indol motilidade (SIM) determina se

os microorganismos têm motilidade ou não, sendo positivo para a *Salmonella spp.* Na presença de *Salmonella spp.* o meio tríplice açúcar ferro (TSI) apresenta bisel alcalino com produção de gás positiva ou negativa e o meio ágar lisina ferro (LIA) mostra-se alcalino na base e com ou sem presença de gás H<sub>2</sub>S. O caldo ureia apresenta reação de urease-negativa para a presença de *Salmonella spp.* A interpretação dos resultados dos testes é realizada após a incubação a 37°C por 24 horas. Testes adicionais incluem fermentação de arabinose, utilização de citrato, fermentação de ramnose e trealose, dentre outros (HOLT et al., 1994; BUSSE, 1995; WRAY e WRAY, 2000).

A sorologia é realizada após a confirmação bioquímica, utilizando antisoros polivalente somático (O) e flagelar (H) para *Salmonella spp.*, a qual é realizada pelos laboratórios credenciados ou de referência (D'AOUST, 1994; BRASIL, 2003).

Devido a estas inúmeras etapas, este método de rotina requer mais de cinco dias para emitir um diagnóstico positivo. São ainda trabalhosas, pela necessidade de um grande número de reagentes e vidraria, principalmente se for processado um grande número de amostras, como as que são exigidas pelas indústrias de alimentos. Além disto, falsos negativos podem ocorrer se a quantidade de bactérias presente na amostra for pequena ou se houver administração de antimicrobianos. Esse período demasiado longo pode comprometer as medidas de controle em frigoríficos ou até mesmo a exportação de produtos e subprodutos cárneos (SANTOS et al., 2001).

### **2.2.3.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV)**

O meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) é derivado de melhorias efetuadas ao longo do tempo no Caldo Rappaport. É utilizado para detecção de *Salmonella spp.* móvel e é um meio oficial segundo *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. O princípio dos meios semi-sólidos está na obtenção de uma maior especificidade e facilidade de isolamento de *Salmonella spp.* porque estão combinados em um único meio de enriquecimento, o crescimento seletivo e a capacidade de produzir flagelos, característica da maioria destas bactérias. Este teste como meio de enriquecimento seletivo e diferencial para *Salmonella spp.*, destaca-se pela sua simplicidade, rápida resposta, obtenção das

culturas migratórias em 48 horas após o pré-enriquecimento e baixo custo (FRANCHIN et al., 2006).

As modificações iniciaram-se a partir do caldo de Rappaport, o qual é incubado a 35°C, e é baseado na habilidade da *Salmonella* spp. em sobreviver em um meio de cultura de pressão osmótica relativamente elevada, capacidade de multiplicação em pH reduzido (5,2) e maior resistência ao verde malaquita, em conjunto com uma menor demanda nutricional. Algumas modificações foram introduzidas por Vassiliadis et al. (1976) no caldo Rappaport, como a redução na concentração de verde malaquita, o aumento na temperatura de incubação de 35°C para 43°C e a sua utilização após uma etapa de pré-enriquecimento. Esta modificação foi denominada meio de Rappaport-Vassiliadis (MRV), que apresentou uma maior atividade inibitória sobre a microbiota competidora do que a fórmula original (XIROUCHAKI et al., 1982; VASSILIADIS, 1983).

Um meio similar foi proposto por De Smedt et al. (1986), contendo 2,7g de ágar, 37mg de verde malaquita oxalato, 23,3g MgCl<sub>2</sub> e novobiocina. O conteúdo de nutrientes também foi reduzido, assim como a temperatura, para 42°C. Após estas modificações, o meio foi chamado MSR.V. A eficiência do meio é decorrente da habilidade da *Salmonella* spp. em migrar através do meio altamente seletivo e pH reduzido, o que minimiza a migração da maioria das Enterobacteriaceae móveis, exceto espécies de *Salmonella* spp. Se presente na amostra, a *Salmonella* spp. forma zonas de migração circular na superfície do meio, atingindo de 10 a 40 mm de raio em 24 horas (DE SMEDT et al., 1986). Se o meio permanecer de coloração azul, sem formação de zona turva, o teste é considerado negativo (ausência de *Salmonella* spp. móvel).

### **2.2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Atualmente há necessidade de técnicas de detecção que demandem menor tempo de resposta e maior precisão de diagnóstico, principalmente para monitoria da produção animal, fabricação de alimentos e produto final. Dentre as metodologias passíveis de serem utilizadas destaca-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Segundo Pérez et al. (2008) esta técnica revolucionou o diagnóstico das

doenças infecciosas, pois permite a detecção e identificação rápida e precisa, estabelecendo o resultado em um a três dias.

Por ser uma técnica altamente específica, a PCR pode ser realizada utilizando o DNA cromossomal ou mesmo o DNA plasmidial, sendo assim possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie. Pode ser feita para detecção do agente ou até mesmo de fatores de virulência (DOUBLET et al., 2008). Um dos fatores limitantes para a detecção de agentes microbianos através da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais, é a presença de substâncias as quais inibem ou reduzem a eficiência da amplificação como sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteinases no leite e ureia na urina que podem comprometer a confiabilidade do teste (SCHRANK et al., 2001; ANDRADE et al., 2010).

Com o surgimento de kits comerciais, que tornaram esta técnica mais acessível, ela deixou de ser empregada somente em laboratórios de pesquisa e passou a ser utilizada em laboratórios de controle de qualidade. O mesmo pode ser aplicado ao PCR em tempo real, que é mais rápido e confiável, e pode ser utilizado em diferentes produtos da agroindústria (MALORNY et al., 2007; PATEL e BHAGWAT, 2008). Contudo, a complementação do diagnóstico é necessária, uma vez que falsos negativos podem ocorrer devido a substâncias inibitórias bem como falsos positivos, pois o método é baseado na amplificação de material genético, que pode ser de bactéria morta, não culturável ou degradada (WILSON, 1997).

#### **2.2.3.4 ELISA e ELFA ELISA**

As indústrias de alimentos necessitam de resultados em menor tempo para reduzir a estocagem de produtos e custos associados, assim, métodos rápidos para detecção de *Salmonella* spp., por exemplo, o ensaio imunoenzimático – ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) são utilizados com frequência por causa do seu benefício de detecção rápida e eficiente (ANDRADE et al., 2010).

O primeiro imunoensaio para *Salmonella* spp. foi realizado em 1977 e, desde então, vários testes de ELISA têm sido desenvolvidos (LOGUERCIO et al., 2002; KICH et al., 2007). A possibilidade do uso de ELISA para detectar *Salmonella* spp. em alimentos já foi estudada em diversos trabalhos, onde se verificou que essa

técnica, quando empregada em culturas puras ou aplicada em alimentos experimentalmente ou naturalmente contaminados, apresentou alta especificidade e/ou sensibilidade nos vários tipos de alimentos testados (FELDSINE et al., 1993).

O teste de ELISA baseia-se nas propriedades de duas moléculas biológicas: o antígeno e o anticorpo. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto o outro reagente pode ser ligado a uma enzima. Esta é catalizadora de reações químicas e pode ser detectada pela adição de um substrato. Testes de ELISA usando anticorpos policlonais e monoclonais para *Salmonella* spp. estão disponíveis comercialmente em forma de kits. Além disto, o uso de anticorpos monoclonais mostrou-se mais sensível na detecção desta bactéria (LOGUERCIO et al., 2002; KICH et al., 2007). Em comparação com o método convencional, o teste de ELISA é mais rápido e barato, além de poder ser automatizado, porém, resultados falso-positivos e/ou falso-negativos podem ocorrer (BEUMER et al., 1991; TAPCHAI SRI et al., 1999; FARZAN et al., 2007). Além disto, o teste pode ser usado para detecção de anticorpos em soro, plasma e suco de carne (FARZAN et al., 2007).

TAPCHAI SRI 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 microbiológico convencional, PCR e ELISA, respectivamente. Nesse estudo foram realizadas análises de sensibilidade, especificidade, eficácia e valores preditivos positivos e negativos entre os três testes, concluindo-se que o teste ELISA é o mais simples, rápido, sensível, específico, além de apresentar baixo custo.

Já o método ELFA ELISA (*Enzyme-Linked Fluorescence Assay*) para detecção de agentes consiste na captura do antígeno alvo através de anticorpos específicos tratados previamente que melhoram a sensibilidade e especificidade. Um segundo anticorpo conjugado com a enzima fosfatase alcalina fixa-se ao antígeno capturado e a detecção final é dada pela intensidade da fluorescência (FLOWERS et al., 1989).

#### **2.2.3.4.1 ELFA ELISA com a tecnologia do bacteriófago**

Os fagos, como são chamados, são vírus que a milhões de anos vem se especializando em colonizar determinados tipos de bactéria (GOODRIDGE e ABEDON, 2003). O ELFA ELISA usando a tecnologia do bacteriófago apresenta os mesmos princípios do teste ELFA ELISA, mas usando uma proteína recombinante específica de um fago capaz de colonizar bactérias do gênero *Salmonella*, no lugar dos anticorpos.

Este teste possui um menor tempo de incubação por necessitar de um menor número de bactérias para detecção, é mais simples de realizar que as demais metodologias e muito mais rápido também, além de que por se tratar de um fago ele se torna mais sensível e específico que um anticorpo.

O sistema VIDAS<sup>®</sup> (Biomerieux), utilizado para a detecção de *Salmonella* spp., é um imunoanalisador automático de múltiplos parâmetros, cujo equipamento inclui um computador, um módulo analítico e uma impressora. O módulo analítico contém cinco sítios independentes capazes de realizar simultaneamente seis amostras cada um, totalizando 30 amostras por cada ciclo. O sistema é capaz de processar até 60 análises por hora, e utiliza o método ELFA ELISA.

Uma modificação no sistema VIDAS<sup>®</sup> (Biomerieux), utilizando a tecnologia do bacteriófago originou um novo kit denominado VIDAS UP<sup>®</sup> (Biomerieux), também destinado à detecção de *Salmonella* spp.. Outra diferença deste kit é que ele dispensa os meios de enriquecimento, passando diretamente do pré-enriquecimento para o equipamento. Outra diferença é que o VIDAS Salmonella UP<sup>®</sup> utiliza um suplemento introduzido diretamente no PBS, que tem o objetivo de enriquecer e selecionar a microbiota da amostra. Além disso, seu cone (SPR<sup>®</sup>) utiliza ao invés de anticorpos, somente proteínas específicas que aumentam a sensibilidade na detecção.

Esses barretes são colocados no equipamento juntamente com um mini-cone (SPR<sup>®</sup>) que além de pipetador, serve também de fase sólida e contém as proteínas específicas dos anticorpos que vão passando automaticamente pelos poços distintos. No SPR<sup>®</sup>, os antígenos se ligam aos anticorpos específicos, são lavados, em seguida, outros anticorpos ligados a uma enzima fluorescente (fosfatase alcalina) também se ligam ao antígeno formando o sanduíche. Após se sucedem novas lavagens do cone para retirar tudo o que não está conjugado e no último poço o equipamento faz a leitura através da intensidade da fluorescência emitida que é interpretada pelo equipamento. Os resultados completos são emitidos em 50

minutos após a fase de enriquecimento e são interpretados pelo sistema do equipamento como positivo ou negativo para o antígeno em questão.

O equipamento VIDAS<sup>®</sup>, otimiza o espaço do laboratório, é fácil de usar, diminui a mão de obra requerida, torna as interpretações dos resultados mais específicas, objetivas e reduz o risco de manipulação de contaminantes durante as análises, sendo capaz de armazenar a rastreabilidade completa de todos os testes realizados pelo equipamento através de um código de barras para cada teste.



**3 ARTIGO**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ELFA ELISA UTILIZANDO  
BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE E OUTROS MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM  
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

## **Análise comparativa entre ELFA ELISA utilizando bacteriófago recombinante e outros métodos diagnósticos para detecção de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal**

### **ABSTRACT**

The analyzes for *Salmonella* spp. detection are of great importance in the process of agribusiness from products of animal origin, because they reflect directly on the microbiological quality of food, impacting the storage time and therefore the release of the product for sale. The present study verified the efficiency of a new ELFA ELISA test using a recombinant protein from bacteriophage (VIDAS UP<sup>®</sup>) to detect the presence of *Salmonella* spp. in products of animal origin. Two hundred fifteen samples (15 samples artificially contaminated and 200 samples from agribusiness routine), from different products of animal origin were analyzed. The samples were tested by five methods of diagnosis: ELFA ELISA, conventional methodology in accordance with ISO 6579, polymerase chain reaction - PCR, semi-solid Rappaport-Vassiliadis Modified - MSR/V and MSR/V medium + supplement. Eleven out of 215 (5.12%) samples were positive in at least one test, which four samples were from agribusiness routine and seven were from artificially contaminated samples. The sensitivity and specificity of the ELFA ELISA when compared with the conventional method was 90.0% and 99.51% respectively. The ELFA ELISA was equivalent to the other methodologies, showing to be effective and rapid to detect *Salmonella* spp. in different products of animal origin.

**Key words:** Food, *Salmonella* spp., diagnostic, ELFA ELISA, bacteriophage.

### **RESUMO**

As análises para detecção de *Salmonella* spp. são de grande importância no processo da agroindústria de produtos de origem animal, pois refletem diretamente na qualidade microbiológica dos alimentos, impactando no tempo de estocagem e por conseguinte na liberação do produto para venda. O presente trabalho verificou a eficiência de um novo teste ELFA ELISA utilizando proteína recombinante oriunda de bacteriófago (VIDAS UP<sup>®</sup>) para detectar a presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal. Foram analisadas 215 amostras (15 amostras

artificialmente contaminadas e 200 amostras de rotina da agroindústria), de diferentes produtos de origem animal. As amostras foram submetidas a cinco métodos de diagnóstico: ELFA ELISA, metodologia convencional de acordo com ISO 6579, reação em cadeia da polimerase - PCR, meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis modificado - MSR/V e meio MSR/V + suplemento. Onze amostras das 215 (5,12%) foram positivas em pelo menos um dos testes, sendo quatro amostras de rotina da agroindústria e sete amostras artificialmente contaminadas. A sensibilidade e especificidade do teste ELFA ELISA com a metodologia convencional foi de 90,0% e 99,51%, respectivamente. O teste ELFA ELISA apresentou equivalência com as demais metodologias, mostrando ser eficaz e rápido na detecção de *Salmonella* spp em diferentes produtos de origem animal.

**Palavras-chave:** Alimentos, *Salmonella* spp., diagnóstico, ELFA ELISA, bacteriófago.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, *Salmonella* spp. tem sido um dos principais agentes relacionados a surtos de toxinfecção em humanos (WEGENER e BAGER, 1997, WHO, 2007). A salmonelose humana ocorre, principalmente, devido ao consumo de alimentos e água contaminados com *Salmonella* spp. Vários alimentos já foram associados à esta infecção, como derivados de carne e subprodutos de origem avícola e suína (JACKSON et al., 1991; TEMELLI et al., 2012).

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos compreende etapas de cultura dispendiosas e trabalhosas, além de laboriosas, necessitando de três a cinco dias para confirmação do resultado (WRAY e WRAY, 2000; WHO, 2007). Para a indústria de alimentos, que retém seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos frente a um patógeno pesquisado, este tempo significa perdas econômicas. Desta forma, o uso de metodologias de diagnóstico de *Salmonella* spp. de rápida detecção, simples e confiáveis, são imprescindíveis tanto em monitoria da produção animal, fabricação de alimentos e produto final além de diagnóstico em casos de toxinfecção.

Novas técnicas de diagnóstico de *Salmonella* spp. vem sendo estudadas e analisadas em relação a especificidade e sensibilidade. Dentre os testes destacam-

se a reação em cadeia da polimerase (PCR), cultivo em meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV), ELISA, ELFA-ELISA, e mais recentemente um teste ELFA ELISA usando bacteriófago recombinante (FLOWERS et al., 1989; BEUMER et al., 1991; FRANCHIN et al., 2006; SOUSA et al., 2007; PÉREZ et al., 2008). Neste estudo avaliamos a metodologia ELFA ELISA com bacteriófago recombinante (VIDAS UP<sup>®</sup> - Biomerieux) frente aos métodos já consagrados de detecção, em produtos de origem animal e do processamento da agroindústria.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostragem

Foram analisadas 215 amostras (15 amostras artificialmente contaminadas e 200 amostras de rotina da agroindústria), de 21 diferentes produtos de origem animal (Tabela 1). Destes 21 produtos, 52,38% eram de origem avícola, 28,57% eram de origem suína e 19,05% eram de origem de produtos do processo fabril. As amostras avaliadas foram selecionadas aleatoriamente, de acordo com o fluxo da rotina laboratorial, oriundas de três diferentes unidades fabris.

Amostras artificialmente contaminadas: industrializados de frango sabidamente negativos para *Salmonella* spp. foram contaminados com cepa padrão de *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Foi realizado diluição em base 10 e 1mL de cada diluição foi inoculado em placas Petrifilm<sup>®</sup> (3M), para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC).

### 3.2.2 Análises laboratoriais

As amostras foram homogeneizadas e 50±0,5g do produto foi pesado e subdividido em duas partes de 25±0,5g, utilizando o Dilumat 4<sup>®</sup> (AES - Biomerieux). Uma amostra foi pré-enriquecida em 225mL de água peptonada tamponada (BPW), seguido por incubação a 37°C por 24 horas, a qual foi destinada para teste com a metodologia convencional de acordo com ISO 6579, PCR e meio MSRV. A outra amostra foi submetida ao mesmo procedimento, porém foi adicionado suplemento (SPT<sup>®</sup> - Biomerieux) e incubada a 41,5°C por 18h, a qual destinou-se para o teste de ELFA ELISA e para o teste em meio MSRV + suplemento.

### **3.2.2.1 Metodologia convencional de acordo com ISO 6579**

Este método foi realizado de acordo com a norma da ISO (*International Organization for Standardization*) 6579 para alimentos cárneos. Após o pré-enriquecimento foi realizado enriquecimento seletivo em dois diferentes caldos, um utilizando 1mL do caldo de pré-enriquecimento em 10mL de caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) a 41,5°C por 24 horas e outro utilizando 1mL do caldo de pré-enriquecimento em 10 mL de caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn) a 37°C por 24 horas. Dos caldos RVS e MKTTn foi feito plaqueamento em meio ágar XLD e em ágar verde brilhante e as placas incubadas a 37°C por 24 horas.

### **3.2.2.2 ELFA ELISA com bacteriófago recombinante**

O teste foi realizado utilizando o kit VIDAS UP<sup>®</sup> (Biomerieux), seguindo recomendações do fabricante. Após o pré-enriquecimento, uma alíquota de 0,5 mL da amostra enriquecida foi colocada no dispositivo Heat and Go<sup>®</sup> (Biomerieux) e incubada a 132°C por cinco minutos e transferida para o equipamento VIDAS<sup>®</sup> (Biomerieux), a 37°C por aproximadamente 48 minutos, onde foi realizado o teste qualitativo para *Salmonella* spp.

### **3.2.2.3 MSRV e MSRV + suplemento**

Este método foi realizado de acordo com o descrito por De Smedt et al. (1986) e Franchin et al. (2006) utilizando o meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (Acumedia 7511) acrescido de 1mL de novobiocina a 2% (Inlab 5701). As placas foram incubadas a 42°C por 24 horas, no qual as que apresentaram halo de migração visível foram plaqueadas em meio ágar XLD e em ágar verde brilhante e incubadas a 37°C por 24 horas.

### **3.2.3.4 PCR**

O teste foi realizado utilizando o sistema automatizado BAX<sup>®</sup> *Salmonella* System (Du Pont), seguindo recomendações do fabricante.

### 3.2.3 Análise estatística

As quatro diferentes metodologias foram comparadas com a metodologia convencional de acordo com a ISO 6579. Foi avaliada a sensibilidade e especificidade entre elas, utilizando o procedimento FREQ do programa SAS.

## 3.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

No total, duzentas e quinze amostras foram avaliadas, e 10 (4,65%) foram positivas para *Salmonella* spp. pela metodologia convencional (ISO 6579) (Tabela 2). Ao avaliar somente as amostras artificialmente contaminadas, sete das 15 (46,66%) foram positivas. Das duzentas amostras de produtos de origem animal e do processamento da agroindústria testadas somente três amostras foram positivas (1,5%), sendo uma amostra de industrializado de ave cru, uma carne moída de frango e uma de carne mecanicamente separada de frango (CMS).

A avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos, quando comparados com a metodologia convencional estão evidenciados na figura 1. Uma amostra (carcaça de frango), não foi positiva na metodologia convencional, mas foi positiva em outros métodos. Já outra amostra (carne moída de frango), que foi positiva na metodologia convencional, positivou apenas no meio MSRV. Oito das onze amostras positivas foram positivas em todas as metodologias analisadas (Tabela 2), mostrando alta correlação entre os métodos.

Vários estudos compararam o ELFA ELISA com outras metodologias para detecção de *Salmonella* spp. e observaram resultados semelhantes, contudo aqui foi usada uma tecnologia diferencial com bacteriófago recombinante. De Medici et al. (1998) e McMahon et al. (2004) indicaram grande concordância entre ELFA ELISA e a metodologia convencional. Já Reiter et al. (2007) encontraram maior percentual de amostras positivas no ELFA ELISA do que na metodologia convencional. Uyttendaele et al. (2003), ao avaliarem produtos de origem aviária, detectaram amostras positivas somente pela metodologia convencional e nenhuma pelo ELFA ELISA. Uma explicação para estes achados deve-se a presença de *Salmonella* spp. em contagens abaixo do limite de detecção do ELFA ELISA (<90 ufc/mL) mas no limite de detecção do isolamento convencional (9 a <90 ufc/mL). Outra possível razão para esta diferença é que as células bacterianas podem ter sido danificadas pelo frio ou calor, ou que não tenham sido recuperadas pelas etapas de

enriquecimento do método ELFA ELISA (UYTTENDAELE et al., 2003; FAKHR et al., 2006; JASSON et al., 2011).

Foram obtidos os mesmos resultados utilizando tanto a metodologia VIDAS UP<sup>®</sup> como PCR, mas ambas apresentaram 90% de sensibilidade quando comparadas com a metodologia convencional. Contudo, resultados falsos positivos na PCR já foram observados em outros estudos (FAKHR et al., 2006; O'REGAN et al., 2008; BOHAYCHUK et al., 2007; EYIGOR et al., 2010). A sensibilidade da 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 culturável ou degradada (WILSON, 1997; UYTTENDAELE et al., 2003).

A metodologia MSR/V detecta somente *Salmonella* spp. móvel. Apesar de existir menos de 0,1% de *Salmonella* spp. imóvel, resultados falso negativos podem ocorrer (OGGEL et al., 1990). O fato de ter sido detectado amostras pelo PCR, mas não pelo MSR/V, novamente pode ser explicado também pelo fato de que o DNA pode ser detectado em células mortas e amplificados por PCR, não diferenciando *Salmonella* spp. viável de não viável (WILSON, 1997).

O fato de uma amostra ser negativa em algum dos testes, mas positiva na metodologia convencional, fez com que a sensibilidade do teste usado como comparação fosse reduzida. Outro fator que pode ter influenciado na sensibilidade dos testes foi o baixo número de amostras positivas, mesmo utilizando amostras artificialmente contaminadas. Não houve diferença entre os testes com relação à especificidade (Figura 1). A metodologia convencional descrita na ISO 6579 há muito tempo vem sendo utilizada como método de escolha para comparativo de novos testes, contudo, existem ressalvas, devido principalmente à alta sensibilidade e especificidade de novas metodologias.

Neste estudo, foi determinado que a metodologia VIDAS UP<sup>®</sup> utilizando bacteriófago recombinante foi altamente sensível e específica na detecção de *Salmonella* spp. Este teste é rápido e pode ser usado no *screening* de amostras de produtos de origem animal para detecção de *Salmonella* spp. A principal vantagem deste método quando comparado com os demais é a rapidez e praticidade na obtenção do diagnóstico, levando horas, ao invés de dias ou semanas, o que diminui os custos em frigoríficos, principalmente os relacionados à estocagem.

### 3.4 CONCLUSÃO

A metodologia VIDAS UP<sup>®</sup> utilizando bacteriófago recombinante foi altamente sensível e específica na detecção de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal e do processamento da agroindústria podendo ser utilizada em substituição aos métodos convencionais.

### 3.5 AGRADECIMENTOS

A Biomerieux<sup>®</sup> pelo suporte financeiro. À empresa BRF - Brasil Foods que permitiu a realização do experimento.

### 3.6 REFERÊNCIAS

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

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.

DE MEDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C.; CACIOLO, D.; FOSCHI, G.; OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. v.45, n.3, p.205-210, 1998.

DE SMEDT, J.M.; BOLDERDIJK, R.F.; RAPPOLD, H.; LAUTENSCHLAEGER, D.; Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. *Journal of Food Protection*. v.49, n.7, p.510-514, 1986.



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.

FLOWERS, R.S.; KLATT, M.J.; KEELAN, S.L.; SWAMINATHAN, B.; GEHLE, W.D.; CHANDONNET, H.E. Fluorescent enzyme immunoassay for rapid screening of Salmonella in foods: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. v.72, n.2, p.318-325, 1989.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; ANDRADE, D.F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I.G.; BATISTA, C.R.V. Comparison of the BAX® system with an in-house MSR/V method for the detection of salmonella in chicken carcasses and pork meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.37, n.4, p.521-526, 2006.

ISO, EN ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. 2002.

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.

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.

OGGEL, J.J.; NUNDY, D.C.; RANDALL, C.J. Modified 1-2 Test system as a rapid screening method for the detection of Salmonella in foods and feeds. *Journal of Food Protection*. v.53, n.8, p.656-658, 1990.

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.

PÉREZ, C.M; SÁNCHEZ, M.M.; HENAO, S.; CARDONA-CASTRO, N.M. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de Salmonella enterica subespecie enterica en huevos. *Archivos de Medicina Veterinária*. v.40, p.235-242, 2008.

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.

SOUSA, M.F.P.; SOARES, C.O.; CARRIJO, A.S. Salmonella sp. em avicultura industrial: diagnóstico imunológico e molecular. *Higiene Alimentar*. v.21, n.153, p.53-58, 2007.

TEMELLI, S.; EYIGOR, A.; CARLI, K.T. Salmonella detection in poultry meat and meat products by the Vitek immunodiagnostic assay system easy Salmonella method, a LightCycler polymerase chain reaction system, and the International Organization for Standardization method 6579. *Poultry Science*. v.91, n.3, p.724-731, 2012.

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.386-391, 2003.

WEGENER, H.C e BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosisIn: In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 1997. Proceedings... Copenhagen, p.3-8. 1997.

WHO. World Health Organization. Food safety and foodborne illness. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> Acesso em: 27 de maio de 2012.

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

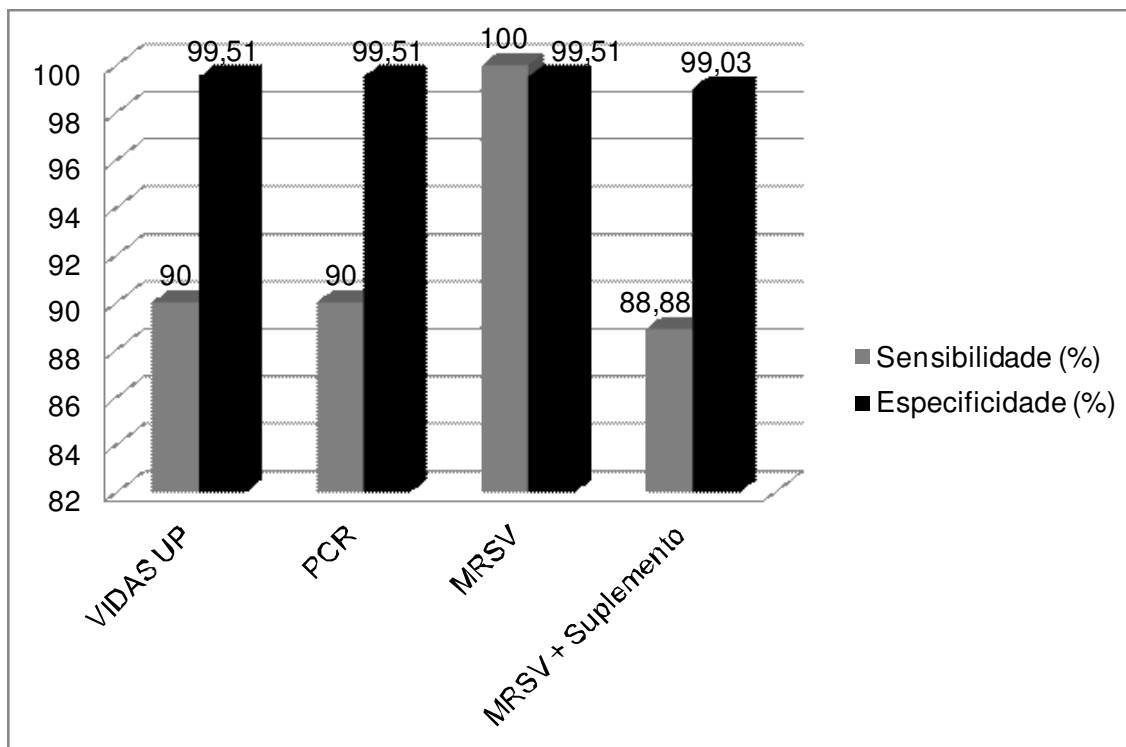
WRAY, C. e WRAY, A. Salmonella in Domestic Animals. Oxon, United Kingdom: CABI Publishing; 2000. 462p.

**Tabela 1-** Produtos de origem animal e do processamento da agroindústria, testados para *Salmonella* spp. por metodologia convencional, VIDAS UP<sup>®</sup>, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>N</b>
Água de Chiller	9
Swab de ambiente	1
Amostra artificialmente contaminada	15
Carcaça de Frango	21
Carne de frango In Natura	43
Carne moída de frango	10
Carne suína In Natura	14
CMS de frango	8
Condimento	1
Estômago de suíno	1
Farinha de pena	4
Farinha de vísceras	1
Gema	1
Gordura de aves	4
Gordura suína	1
Industrializado de aves cozido	60
Industrializado de aves cru	7
Industrializado de suíno cozido	5
Industrializado de suíno cru	3
Miúdo de aves	4
Pele de aves	1
Tripa suína	1
<b>TOTAL</b>	<b>215</b>

**Tabela 2-** Amostras positivas para *Salmonella* spp. testadas na metodologia convencional, VIDAS UP<sup>®</sup>, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento.

Identificação da amostra	Produto	Metodologia				
		Tradicional	VIDAS UP <sup>®</sup>	PCR	MSRV	MSRV + Suplemento
562	Carcaça de Frango		X	X		X
2575590	Industralizado Ave Cru	X	X	X		
01T	Carne Moída Frango	X			X	
11T	CMS de frango	X	X	X	X	X
719 - Diluída 10 <sup>6</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
720 - Diluída 10 <sup>6</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
721 - Diluída 10 <sup>6</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
719 - Diluída 10 <sup>8</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
720 - Diluída 10 <sup>8</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
721 - Diluída 10 <sup>8</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X
721 - Diluída 10 <sup>10</sup>	Artificialmente contaminada	X	X	X	X	X



**Figura 1-** Determinação da sensibilidade e especificidade das metodologias VIDAS UP<sup>®</sup>, PCR, MRSV e MRSV + Suplemento em comparação com a metodologia convencional, utilizando o procedimento FREQ (SAS).



#### **4. PERSPECTIVAS**

Este trabalho pretende disponibilizar informações confiáveis sobre este novo kit comercial, para que possa ser uma alternativa disponível para o uso na rotina dos laboratórios de alimentos e de sanidade animal, facilitando assim o fluxo de trabalho, aumentando acurácia e reduzindo o tempo para a realização das análises.

Sugere-se o teste de maior número de amostras naturalmente infectadas, a fim de melhorar a correlação entre os testes atualmente disponíveis.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.24, n.2, p.80-84, 2004.

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

BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. **Veterinary Microbiology**. v.130, n.1-2, p.1-19, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa nº62 de 26/08/2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, 18/09/2003, Seção 1, p.14, 2003. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRYAN, F.L. Current trends in foodborne Salmonellosis in the United States and Canada. **Journal of Food Protection**. v.44, n.5, p.394-402, 1981.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**. v.26, n.1, p.117-131, 1995.

CARLSON, A.R. e BLAHA, T. On-farm salmonella control procedures what is known? Investigations into zoonotic salmonella in Minnesota. In: SWINE DISEASE CONFERENCE FOR SWINE PRACTITIONERS, 1998. **Proceedings...** AMES, IA, p.141-152, 1998.

D'AOUST, J.Y. Salmonella and international trade. **International Journal of Food Microbiology**.v.24, n.4, p.11-31, 1994.

DE SMEDT, J.M.; BOLDERDIJK, R.F.; RAPPOLD, H.; LAUTENSCHLAEGER, D.; Rapid Salmonella detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection**. v.49, n.7, p.510-514, 1986.

DOUBLET, B.; DOUARD, G.; TARGANT, H.; MEUNIER, D.; MADEC, J.Y.; CLOECKAERT, A. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug resistant strains. **Journal of Microbiological Methods**. v.75, n.2, p.359-361, 2008.

DUGUID, J.P. e NORTH, R.A. Eggs and Salmonella food-poisoning: an evaluation. **Journal Medical Microbiology**. v.34, n.2, p.65-72, 1991.

FARZAN, A.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining Salmonella status of a pig herd. **Epidemiology and Infection**. v.135, n.2, p.238–244, 2007.

FELDSINE, P.T.; FALBO-NELSON, M.T.; HUSTEAD, D.L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile Salmonella in foods: Comparative study. **Association of Official Analytical Chemists Journal**. v.76, n.3, p.694-697, 1993.

FLOWERS, R.S.; KLATT, M.J.; KEELAN, S.L.; SWAMINATHAN, B.; GEHLE, W.D.; CHANDONNET, H.E. Fluorescent enzyme immunoassay for rapid screening of

Salmonella in foods: collaborative study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**. v.72, n.2, p.318-325, 1989.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; ANDRADE, D.F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I.G.; BATISTA, C.R.V. Comparison of the BAX® system with an in-house MSRv method for the detection of salmonella in chicken carcasses and pork meat. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, n.4, p.521-526, 2006.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in Salmonella isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**. v.67, n.6, p.1229-1233, 2004.

GOODRIDGE, L. e ABEDON, S.T. Bacteriophage Biocontrol and Bioprocessing: Application of Phage Therapy to Industry. **SIM News**. v.53, n.6, p.254-262, 2003.

GRIFFITH, R.; SCHAWRTZ, K.; MEYERHOLZ, D. Salmonella. In: STRAW, B.; ZIMMERMAN, J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltda; 2006. p. 739–754.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D., WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**. v.161, n.1, p.26-29, 2010.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNATH, P.H. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Williams & Wilkims, 1994. 787p.

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

ISO, EN ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. 2002.

KICH, J.D.; SCHWARZ, P.; SILVA, L.E.; COLDEBELLA, A. PIFFER, I.A.; VIZZOTO, R.; CARDOSO, M.R.I. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent Salmonella serovars in swine in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.19, n.5, p.510-517, 2007.

LETELLIER, A.; BEAUCHAMP, G.; GUÉVREMONT, E.; D'ALLAIRE, S.; HURNIK, D.; QUESSY, S. Risk factors at slaughter associated with presence of Salmonella on hog carcasses in Canada. **Journal of Food Protection**. v.72, n.11, p.2326-2331, 2009.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G.; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M. Elisa indireto na detecção de Salmonella spp. em lingüiça suína. **Ciência Rural**. v.32, n.6, p.1057-1062, 2002.

MALORNY, B.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. A real-time PCR for detection of Salmonella enteritidis in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiological Methods**. v.70, n.2, p.245-251, 2007.

MOLBAK, K.; OLSEN, J.E.; WEGENER, H.C. Salmonella infections. **Foodborne Infections and Intoxications**. 2006. p. 57-114.

PATEL, J.R. e BHAGWAT, A.A. Rapid real-time PCR assay for detecting Salmonella in raw and ready-to-eat meats. **Acta Veterinaria Hungarica**. v.56, n.4, p.451-458, 2008.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por Salmonella Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**. v.35, n.2, p.477-483, 1998.

PÉREZ, C.M; SÁNCHEZ, M.M.; HENAO, S.; CARDONA-CASTRO, N.M. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la

Polimerasa para el diagnóstico de Salmonella enterica subespecie enterica en huevos. **Archivos de Medicina Veterinária**. v.40, p.235-242, 2008.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. Salmonella em carcaças de frangos congelados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.20, n.1, p.39-42, 2000.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; FLORES, M.L. Salmonella enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. v.16, n.102/103, p.93-99, 2002.

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

SAPHRA, I. e WINTER, J.W. Clinical manifestations of salmonellosis in man — An evaluation of 7779 human infections identified at the New York Salmonella Center. **The New England Journal of Medicine**. v.256, n.1, p.1128-1134, 1957.

SCHRANK, I.S.; MORES, M.A.; COSTA, J.L.; FRAZZON, A.P.; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; SILVA, S.C. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect Salmonella in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**. v.82, n.1, p.45-53, 2001.

SCHWARZ, P.; CALVEIRA, J.; SELLA, A.; BESSA, M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CARDOSO, M. Salmonella enterica: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.5, p.1028-1034, 2009.

SHINOHRA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L.L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, M.C.; FARIA, G.S.; PAULA, D.A.J.; MARTINS, R.P.; CARAMORI, J.G.; KICH, J.D.; Colodel, E.M.; Nakazato, L.; Dutra, V. Prevalência de Salmonella sp. em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso. **Ciência Rural**. v.39, n.1, p.266-268, 2009.

SOUSA, M.F.P.; SOARES, C.O.; CARRIJO, A.S. Salmonella sp. em avicultura industrial: diagnóstico imunológico e molecular. **Higiene Alimentar**. v.21, n.153, p.53-58, 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.

TEIXEIRA, R.S. Detecção de Salmonella spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, SP.

TRABULSI, L.R. e ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of Salmonellas: in overview. **Journal Applied Bacteriology**. v.54, n.1, p.69-76, 1983.

VASSILIADIS, P.; PATERNAKI, E.; PAPAICONOMON, N.; PAPADAKIS, J.A.; TRICHOPOULOS, D. Nouveau procede d'enrichissement de Salmonella. **Annales de Microbiologie**. v.127B, p.195-200, 1976.

WEGENER, H.C e BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis: In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 1997. **Proceedings...** Copenhagen, p.3-8. 1997.

WEGENER, H.C.D. e BAGGENSEN, D.L. Investigation of an outbreak human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar *Infantis* by use of pulse field electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. v.32, n.1-2, p.125-131, 1996.

WHO. World Health Organization. Food safety and foodborne illness. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> Acesso em: 27 de maio de 2012.

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

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

XIROUCHAKI, E.; VASSILIADIS, P.; TRICHOPOULOS, D.; MAVROMMATI, C.H. A note on the performance of Rappaport's medium, compared with Rappaport-Vassiliadis broth, in the isolation of *Salmonella* from meat products, after preenrichment. **Journal of Applied Bacteriology**. v.52, n.1, p.125-127, 1982.