



ISOLAMENTO BACTERIOLÓGICO E PCR NA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM PEITO DE FRANGO DE ESTABELECIMENTO VAREJISTA

Raquel Gouvêa^{1*}, Felipe Faccini dos Santos¹, Elmiro Rosendo do Nascimento², Robson Maia Franco³, Virginia Léo de Almeida Pereira²

1 Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense

*autor para correspondência: (quelgouvea@yahoo.com.br)

2 Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública – MSV- Universidade Federal Fluminense, cep: 24230-390, Niterói, RJ, Brasil

3 Departamento de Tecnologia dos Alimentos - MTA - Universidade Federal Fluminense, cep: 24230-390, Niterói, RJ, Brasil

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

A salmonelose compreende uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde coletiva por seu difícil controle, causar elevada morbidade e impactos sócio-econômicos. A maioria dos casos de infecção alimentar causada por *Salmonella* spp. decorre do consumo de alimentos contaminados, especialmente a carne de frango e derivados preparados sob condições impróprias de higiene, manipulação e conservação. Para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, o método convencional de isolamento é o mais utilizado e está previsto na legislação brasileira, mas a técnica é demorada e laboriosa. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método rápido e sensível na detecção de agentes como *Salmonella* spp., tem sido bastante estudada e gradativamente empregada nas indústrias de alimentos. O estudo comparou o isolamento bacteriológico convencional, segundo Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) com a PCR, utilizando sequência de oligonucleotídeos derivada do gene *invA* (RAHN *et al.*, 1992) na detecção de *Salmonella* spp. em 27 amostras de peito de frango artificialmente contaminadas com *S. Enteritidis* e em 31 amostras de campo. Nas amostras artificialmente contaminadas, foram recuperadas 97% de *Salmonella* spp. pelo método convencional e 100% pela PCR. Na análise das amostras de campo, duas amostras foram positivas no método de isolamento convencional, porém esse resultado não foi confirmado na PCR. Tanto o método convencional quanto a PCR foram capazes de detectar *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente. No entanto, nas amostras de campo, a detecção de *Salmonella* spp. somente foi possível pelo método convencional. Quanto ao tempo, a PCR foi mais rápida na detecção de *Salmonella* spp. nas amostras testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Método convencional, PCR, *Salmonella* spp.

BACTERIOLOGICAL ISOLATION AND PCR FOR DETECTION OF *SALMONELLA* SPP. IN CHICKEN BREASTS FROM MARKETING ESTABLISHMENTS

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most challenging zoonoses to public health, due to its difficult control, high morbidity, as well as its economic and social impacts. Most cases of *Salmonella* food borne diseases are caused by the ingestion of contaminated food, especially poultry meat and poultry products processed under improper conditions. Conventional culture-based methods are widely used to detect *Salmonella* spp. in foods and it is contemplated in Brazilian law, although the technique is laborious and time-consuming. Polymerase Chain Reaction (PCR) which is a fast, sensitive and useful method to detect food borne pathogens, such as *Salmonella* spp., has been quite researched and gradually employed in food industries. This study compared the conventional culture-based method, according to Instruction No. 62 of Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, to PCR, using oligonucleotides derived from the *invA* gene for *Salmonella* spp. in 27 samples of chicken breast artificially contaminated with *S. Enteritidis* and 31 naturally contaminated samples. *Salmonella* spp. were recovered in 97% of contaminated samples by the conventional method and 100%, by PCR. Both methods were capable of detecting *Salmonella* spp. in artificially contaminated samples. PCR has been faster on detection of *Salmonella* spp. Only conventional culture-based methods could detect *Salmonella* spp. in naturally contaminated samples. Regarding time, the PCR was faster than conventional method on detection of *Salmonella* spp. on the samples tested.

KEYWORDS: Conventional culture-based method, PCR, *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais frequentes no mundo e uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde coletiva, em função da elevada endemicidade e morbidade e pela dificuldade no controle (HOFER *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As salmonelas têm o trato intestinal do homem e dos animais como o seu habitat primário (BAÚ *et al.*, 2001) e podem infectar uma grande variedade de animais e o homem, muitas vezes de forma assintomática (GAST, 2003) e estes indivíduos podem representar importantes fontes de contaminação para os alimentos. Desde a década de 70, a salmonelose tem sido um grande problema para a saúde pública do Brasil e do mundo e os produtos avícolas, em especial, a carne de frango vinculou-se fortemente à doença (CARDOSO & TESSARI, 2008; VAZ, 2012).

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* spp. na carne de frango ao abate variam em função das condições de manejo na criação e dos cuidados higiênicos nas operações de abate e manipulação das carcaças (CARVALHO & CORTEZ, 2005). Além disso, a manipulação inadequada do alimento pronto para o consumo, o consumo da carne ou alimento contaminados mal cozidos, a manutenção do alimento contaminado por muitas horas fora de refrigeração e o aquecimento inadequado antes de servi-lo, podem permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. em níveis passíveis de ocasionar surtos de infecção alimentar (GAST, 2003; OPS, 2003).

Programas governamentais de controle e prevenção da *Salmonella* em toda a cadeia de produção avícola e educação sanitária dos consumidores surgiram no

intuito de minimizar a vinculação da ingestão dos produtos avícolas à salmonelose (VAZ, 2012). Nesse sentido, foi instituído o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus, pela Instrução Normativa nº70, de 10 de outubro de 2003. Este Programa teve como objetivo, verificar a prevalência de *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, formar um banco de informações sobre os índices de contaminação, estabelecer padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação de *Salmonella* spp. em produtos avícolas e realizar o monitoramento constante do nível de contaminação nos estabelecimentos de abate de aves, por meio da análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura*. (BRASIL, 2003a).

Os sintomas da salmonelose são inespecíficos e surgem em 12 a 14 horas após a ingestão do alimento. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida e 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005). A salmonelose geralmente tem cura espontânea e a recuperação clínica se dá em até quatro dias, todavia, o indivíduo portador convalescente pode eliminar a bactéria por semanas ou até por alguns meses (OPS, 2003).

Para o controle da qualidade microbiológica de produtos de origem animal, o método de isolamento bacteriológico convencional de *Salmonella* spp. é amplamente empregado e prescrito em legislações específicas (BRASIL, 1995; 2003b). Consiste nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, identificação bioquímica e prova de soro-aglutinação. Todavia, demanda um tempo mínimo de cinco dias podendo alcançar até sete dias para a obtenção do resultado (DICKEL, 2004; ANDREATTI FILHO, 2011). Métodos de diagnósticos rápidos são extremamente necessários para a indústria de alimentos, pois reduz possíveis perdas econômicas em decorrência da retenção de produtos até a liberação dos resultados de diagnósticos e favorece a tomada de decisões com rapidez (VON RÜCKERT, 2006; BENETTI, 2009).

Métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. têm sido desenvolvidos e utilizados na indústria de alimentos e se baseiam em métodos de hibridização de ácidos nucleicos, métodos imunológicos e métodos moleculares, como PCR (BENETTI, 2009). A PCR foi inicialmente descrita em 1986 pelo pesquisador Kary Mullis (MULLIS *et al.*, 1986) e utiliza-se da síntese de ciclos repetidos de oligonucleotídeos de DNA para conduzir à replicação de sequências definidas, formando a base para a amplificação e detecção de sequências específicas de ácido nucleico (PERSING, 1991). Por detectar uma região única do genoma bacteriano, a técnica da PCR demonstra maior especificidade do que os métodos bacteriológicos usuais (COHEN *et al.*, 1994). A aplicação da PCR, na detecção de alimentos contaminados, animais e pessoas infectadas, é uma estratégia atualmente utilizada e citada por muitos autores como eficiente e rápida e vem sendo empregada com êxito para detecção de vários micro-organismos, como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolytica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* (AABO *et al.*, 1993; BENNETT *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2001; MALORNY *et al.*, 2003).

Este estudo visou comparar o isolamento bacteriológico convencional com a PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de peito de frango artificialmente contaminadas e de campo, comercializadas no varejo, quanto à frequência de detecção e o tempo demandado para as análises.

METODOLOGIA

Duas embalagens de 1,0kg de peito de frango congelado foram transportadas em sua própria embalagem comercial e, após o descongelamento sob refrigeração “overnight”, foram fracionadas em amostras de 25g. Destas, 34 amostras foram submetidas à contaminação artificial e sete foram utilizadas como controles.

Para a análise de peito de frango a campo, foram coletadas 31 amostras resfriadas de peito de frango em estabelecimentos comerciais varejistas. No laboratório, as amostras foram pesadas e separadas em amostras de 25g, colocadas individualmente em sacos plásticos esterilizados próprios para homogeneização, sendo processadas logo em seguida.

Para a contaminação artificial das amostras, foi utilizada cepa liofilizada de *S. Enteritidis* ATCC 13057 adquirida de coleção de cultura da Fundação Oswaldo Cruz, hidratada com 0,5mL de solução salina a 0,85% e recuperada em 10mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI – MERCK® 1.10493) por 18h a 35°C. Em seguida, o cultivo foi semeado em ágar nutriente inclinado e incubado sob mesmas condições. Após o crescimento, foi adicionada solução salina peptonada 0,1% esterilizada para preparo de uma suspensão bacteriana de turvação igual à do padrão nº1 na escala de McFarland, que consiste em 1,0mL de cloreto de bário a 1% com 99mL de ácido sulfúrico a 1% (0,36N), correspondendo a $3,8 \times 10^8$ micro-organismos por mililitro. O inóculo para a contaminação das amostras consistiu em 1,0mL desta suspensão.

O isolamento de *Salmonella* spp. baseou-se na Instrução Normativa nº62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003b).

Para o pré-enriquecimento das amostras, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada 1% a 25g de peito de frango, em saco plástico esterilizado. A mistura foi homogeneizada por aproximadamente 120 segundos em homogeneizador (“Stomacher 80 Laboratory Blender Seward”).

Nas amostras contaminadas artificialmente, o inóculo de 1,0mL da suspensão bacteriana preparada previamente foi adicionado à mistura neste momento. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Alíquotas de 0,1mL foram pipetadas das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV - OXOID® CM669) e 1,0mL para tubos contendo 10mL de caldo Selenito-Cistina (SC - MICROMED® 2087). Os tubos foram incubados a 41°C ± 0,5°C, sob agitação mecânica constante de água por 24 horas.

Para o isolamento, cada cultivo nos caldos de enriquecimento foi semeado, utilizando-se alça de platina, sobre a superfície de quatro meios seletivos em duplicata e cultivados em estufa a 37°C por 24 horas. Como meio de alta seletividade foi utilizado o ágar *Salmonella* Diferencial Modificado – meio RajHans (SDM - HIMEDIA® M1078) e o ágar base Verde Brilhante modificado (VBM - HIMEDIA® M016). Como meio de média seletividade foi utilizado o ágar *Salmonella-Shigella* (SS - MICROMED® 2043) e como meio de baixa seletividade foi empregado o ágar MacConkey (MC - HIMEDIA® M1024).

Para a triagem, foram selecionadas três colônias com características morfológicas compatíveis com *Salmonella* spp. nos meios sólidos utilizados e cada colônia foi semeada em ágar Três-açúcares-ferro (“Triple Sugar Iron”. TSI - HIMEDIA® M021) e em ágar Lisina-ferro (“Lisine Iron Agar” - LIA, HIMEDIA® M377) e incubados a 37°C por 24 horas.

Os cultivos com as características bioquímicas compatíveis com *Salmonella* spp. foram repicados em caldo BHI e incubados a 37°C por 18 horas para a execução dos testes bioquímicos complementares, que foram as provas de urease,

sulfeto-indol-motilidade (SIM) e desaminação da fenilalanina. Os cultivos com características de *Salmonella* spp. foram confirmadas sorologicamente por Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa, com uso do anti-soro polivalente “O” (Probac do Brasil®). Foram depositados sobre a superfície da placa de Huddleson, uma gota da suspensão do cultivo em ágar TSI, e adicionados uma gota de soro anti-salmonela polivalente “O” e uma gota de solução salina 0,1%. Após homogeneização, foi procedida a leitura com iluminação sobre fundo escuro.

As amostras controles, que não foram inoculadas artificialmente com *S. Enteritidis*, e as de campo foram submetidas ao mesmo protocolo para isolamento de *Salmonella* spp. realizado com as amostras inoculadas com *S. Enteritidis*, excluindo-se a etapa de inoculação artificial.

Na PCR, foi empregada metodologia única para amostras inoculadas com *S. Enteritidis* e para amostras de campo.

Seguida a incubação por 24 horas da etapa de pré-enriquecimento do cultivo convencional, procedeu-se à extração do DNA das amostras pelo método do fenol-clorofórmio segundo Sambrook *et al.* (1989).

Para a realização da PCR, foi utilizado um par de “primer” específico para *Salmonella* spp., que amplifica 284 pares de base, com a sequência de oligonucleotídeos derivada do gene *invA*, como se segue (RAHN *et al.*, 1992): 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' e 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'

Foi preparado o “mix” de 21µL para a reação contendo 5,0µL de tampão 10X, 5,0µL de MgCl₂, 5,0µL de dNTP mix (25µM de cada), 100pmol de cada *primer*, 2U de taq DNA polimerase e 2,0µL de DNA purificado. O ciclo de amplificação (“Thermo Electron Corporation PX2 Thermal Cycler”) utilizado foi desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 54°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por sete minutos. O resultado da reação foi obtido por corrida eletroforética a 94V por aproximadamente 45 minutos em gel de agarose a 1,5% e visualização sob luz ultravioleta em transiluminador.

O Teste Exato de Fischer foi aplicado na análise geral dos resultados na comparação dos dois métodos testados para a detecção de *Salmonella* spp.

Para análise do tempo de execução no isolamento bacteriológico convencional, cada etapa foi registrada com data e horário de início e término e, ao final da análise, foi calculado o intervalo de tempo total, ou seja, a duração desde o cultivo no pré-enriquecimento até a leitura das provas bioquímicas. Na PCR, o mesmo procedimento foi empregado, ou seja, foi calculado o intervalo de tempo total desde o cultivo no pré-enriquecimento até a obtenção do resultado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras artificialmente contaminadas, foram recuperadas 97% de *Salmonella* spp. pelo método convencional nas 34 repetições, a partir das características morfocoloniais observadas nos diferentes meios de cultivo, nos meios de triagem e na confirmação pelas provas bioquímicas e sorológicas, e 100% pela PCR.

As amostras controles foram todas negativas no método convencional e na PCR.

Na análise das 31 amostras de campo, duas amostras foram positivas no método de isolamento convencional, porém esse resultado não foi confirmado na PCR. A frequência de detecção de *Salmonella* spp. nos dois métodos testados estão

dispostos na Tabela 1.

Tanto o método convencional quanto a PCR foram capazes de detectar *Salmonella* spp. em amostras contaminadas artificialmente. Nas amostras de campo somente pelo método convencional foi possível a detecção de *Salmonella* spp., o que pode ter ocorrido em função do número superior de bactérias competitivas nas amostras resfriadas, visto que nas análises em amostras artificialmente contaminadas foram utilizadas amostras congeladas e seus controles, não inoculados, também não apresentaram resultados positivos.

Dickel (2004) realizou análise semelhante, onde comparou as técnicas de PCR e ELISA com o método convencional para detecção de *S. Enteritidis* (SE), *S. Typhimurium* (ST), *S. Gallinarum* (SG) e *S. Pullorum* (SP) em carne de frango. As amostras foram contaminadas artificialmente com diluições de 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} para SE e ST e 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para SG e SP. A PCR obteve melhor resultado, seguido da técnica de ELISA e, por último, do método convencional. Quando testadas a campo, em três tipos de matadouros, o método convencional obteve melhor desempenho, seguido de ELISA e da PCR, com menor percentual de recuperação. Estes resultados corroboram os obtidos no presente estudo.

A frequência de detecção de *Salmonella* spp. pela PCR em amostras artificialmente contaminadas no presente estudo, equiparou-se à frequência obtida pelo método convencional e isto pode ter sido influenciado pelo uso de amostras pré-enriquecidas na PCR, como demonstraram Oliveira *et al.*, (2003) e Croci *et al.*, (2004). Oliveira *et al.*, (2003) compararam o método convencional com a PCR a partir de amostras pré-enriquecidas e amostras enriquecidas em caldo RV. Analisaram amostras clínicas e ração para frangos. Como resultados, detectaram mais amostras positivas para *Salmonella* spp. pela PCR do que pelo método convencional quando utilizadas amostras enriquecidas. Entretanto, com amostras pré-enriquecidas, o método convencional foi mais eficiente que a PCR. Myint *et al.*, (2006) realizaram estudo semelhante em amostras de carne de frango resfriadas e também obtiveram melhores resultados na PCR de amostras enriquecidas em dois caldos de enriquecimento em detrimento das amostras pré-enriquecidas. É possível que a PCR realizada a partir de amostras enriquecidas obtivesse melhores resultados, entretanto o tempo utilizado para as etapas prévias diminuiria a vantagem do método em relação a sua rapidez.

Quando comparados os dois métodos, não houve diferença estatística pelo teste exato de Fischer ($p= 0,0291$) quando o mesmo tipo de amostra foi considerado na análise. No entanto, Quando consideradas as proporções de amostras positivas entre as contaminadas artificialmente e amostras de campo, houve diferença significativa como seria esperado.

Em amostras artificialmente contaminadas, constatou-se, na PCR, que aquelas usadas como controle, ou seja, aquelas que não foram contaminadas artificialmente apresentaram bandas de amplificação inespecíficas. O par de "primers" de sequência do gene *invA* utilizado pode ter promovido interação com o DNA de outras bactérias não-salmonelas presentes nas amostras, conforme relatado por Rahn *et al.*, (1992) e Santos *et al.*, (2001). Rahn *et al.*, (1992) também observaram bandas semelhantes em seu estudo cujo objetivo foi testar sequências do gene *invA* pela PCR para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras contendo um grupo variado de outras bactérias. Santos *et al.*, (2001) utilizaram o mesmo par de "primers" e tiveram como resultado uma amostra de *Escherichia coli* com banda de amplificação inespecífica, porém facilmente distinguível de *Salmonella* spp. pelo tamanho do *amplicon* gerado.

Quanto ao tempo de análise demandado nos dois métodos, os resultados da PCR foram obtidos em cerca de dois dias desde a obtenção das amostras de campo, o que está de acordo com Santos *et al.*, (2001) e Von Rückert (2006), e em três dias após a obtenção e preparo das amostras artificialmente contaminadas, conforme Dickel (2004) também encontrou. No método convencional, os resultados foram concluídos em seis a sete dias para as amostras de campo, e em até oito dias, para as amostras artificialmente contaminadas.

CONCLUSÕES

A PCR obteve vantagem em relação ao método convencional quanto ao período de tempo para a obtenção dos resultados, além de ter sido um método tão eficiente quanto o método convencional na detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SØRENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.7, p.171-178, 1993.

ANDREATTI FILHO, R. L.; GONÇALVES, G. A. M.; OKAMOTO, A. S.; LIMA, E. T. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v. 12, n. 1, p. 115-119, 2011

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

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.

BENETTI, T. M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. em lingüiças resfriadas comercializadas no estado do Paraná.** 2009. 134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Saúde Aviária e Doenças. In: ANDREATTI FILHO, R. L. **Salmoneloses Aviárias.** São Paulo: Roca, 2006, seção 2, cap.9, p.84-111.

BLACKBURN, C. W. A review, rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in food. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n.75, v.3. p.199-214, 1993.

BRASIL, MAPA. Portaria nº8, de 23 jan. 1995. Aprova as alterações introduzidas no método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* conforme normas anexas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.1182, 27 jan. 1995, Seção 1, 1995.

BRASIL, MAPA. Instrução Normativa nº70, de 06 out. 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.9, 10 out. 2003, Seção 1, 2003a.

BRASIL, MAPA. Instrução Normativa nº62, de 26 ago. 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003, Seção 1, 2003b.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Biológico**, São Paulo, SP, v.70, n.1, p.11-13, jan./jun., 2008

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.35, n.6, p.1465-1468, 2005.

COHEN, N. D.; MC GRUDER, E. D.; NEIBERGS, H. L.; BEHLE, R. W.; WALLIS, D. E.; HARGIS, B. M. Detection of *Salmonella* Enteritidis in feces from poultry using booster Polymerase Chain Reaction and Oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. **Poultry Science**, Texas, EUA, v.73, p.354-357, 1994.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESHI, G. Comparison of PCR, Eletrochemical Enzyme-linked Imunosorbent Assays, and the Standard Culture method for detecting *Salmonella* in meat products. **Applied and Environmental Microbiology**, Roma, Itália, v.70, n.3, p.1393-1396, 2004.

DICKEL, E. L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate.** 2004. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: BARNES, H. J. et al. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, p. 567-583, 2003. Seção 2, cap. 16. CD-ROM.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. R. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p. 55-62, 1997.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6ed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2005.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of food borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, n.83, p. 39-48, 2003.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: COLD

SPRING HARBOUR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY. **Anais...** 1986, v. LI.

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

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, Porto Alegre, RS. v.36, p. 217-221, 2003.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. **Publicación científica y técnica**. 3ed., v.1, n.580, p. 240-253, 2003.

PERSING, D. H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. **Journal of Clinical Microbiology**, Minesota, EUA, v.29, n.7, p.1281-1285, jul. 1991.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; MC EWEN; GALLAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v.6, p.271-279, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, 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**, v.43, n.5, p.247-250, set. 2001.

VAZ, C. S. L. **Campylobacter na segurança dos alimentos e na avicultura. Estudos da Embrapa.** [s.d.] Disponível em: <http://file.aviculturaindustrial.com.br/Material/AI_0308Embrapa.pdf>

VON RÜCKERT, D. A. S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* spp. em frangos de corte durante o abate.** 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.