

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS
DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA ASSOCIADA A BACTERIÓFAGO
PARA DIAGNÓSTICO DE *Salmonella enterica* EM CARNE DE FRANGO.

ISADORA MAINIERI DE OLIVEIRA CORRÊA

Botucatu, São Paulo.

Agosto, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS
DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA ASSOCIADA A BACTERIÓFAGO
PARA DIAGNÓSTICO DE *Salmonella enterica* EM CARNE DE FRANGO.

ISADORA MAINIERI DE OLIVEIRA CORRÊA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lucio
Andreatti Filho

Nome do Autor: Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa.

Título: SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA ASSOCIADA A BACTERIÓFAGO
PARA DIAGNÓSTICO DE *Salmonella enterica* EM CARNE DE FRANGO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a.Dr^a. Maristela Lovato

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

UFSM – Santa Maria

Prof. Dr. Guilherme Augusto Marietto Gonçalves

Membro

Departamento

UNOESC – Xanxerê

Data da Defesa: 27 de agosto de 2015.

DEDICATÓRIA:

A minha avó Clícia (in memoriam).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Corrêa, Isadora Mainieri de Oliveira.

Separação imunomagnética associada a bacteriófago para diagnóstico de Salmonella enterica em carne de frango / Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho
Capes: 50503014

1. Salmonella enterica. 2. Salmonella enteritidis.
3. Salmonella typhimurium. 4. Frango de corte. 5. Fago.
6. Diagnóstico bacteriológico.

Palavras-chave: Fago P22; Salmonella Enteritis; Salmonella Heidelberg; Salmonella Typhimurium; Teste rápido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho pela excelente orientação, que permitiu a superação dos desafios encontrados durante este período.

Ao Prof. Dr. Hataka pela companhia na hora do chimarrão e amizade.

Ao Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto por sempre auxiliar nas minhas dúvidas e participar, junto com a Tati e o Toshio, dos nossos eventos.

Aos funcionários do Prédio da Patologia, especialmente Claudinei, Val, Soninha e Maury, professores e residentes.

A minha colega de quarto, trabalho e amiga. Agora profe! e Dra. Larissa Quinto Pereira, por ter aguentado meu mau-humor e as artelices da Manuela, mas também proporcionamos muitos momentos engraçados. Não teria conseguido ficar aqui sem a tua presença. Só para constar o quanto ela é especial, este é o terceiro agradecimento que recebe formalmente (relatório de estágio, mestrado e agora a tese).

A equipe do Laboratório de Ornitopatologia, aos que já seguiram com suas carreiras Ana, Taís, Guilherme, Bruna (que nos trocou... tá fazendo falta aqui) e Fe (a Manu fala constantemente da tia Fernanda querida). E os que seguem na lida Carol, Igor, Elisane, Tarcísio de volta com suas cantorias e bom humor (passou Fluoresceína hoje?), Rafaela, Isabella pelo auxílio com os experimentos e amizade.

Agradeço de novo as minhas parceiras de laboratório e “balada” Isa e Rafa, para se sentirem muito especiais na minha vida (e são), muitas histórias e amizade que levarei para sempre. E claro agradeço a Keila Maria pelo suporte emocional e os momentos “desestressantes” nos dias em que tudo dava errado, e nos que davam certo também.

A minha família, principalmente minha mãe Mônica e vô João, por sempre me apoiarem e amenizarem a saudade. Meus tios Marco, Claudio e Flávio pelo carinho e auxílio com a viagem de estudos. A minha mana Luiza, que está prestes a completar 15 anos e eu não estarei junto, de novo. Meu pai Alexandre e minha vó Geni.

A minha segunda família de Botucatu, Norma, Vladmir, Clóvis, Pedro, Regina, Ana Paula e Sáttva, que fizeram eu me sentir em casa e não ter mais vontade de ir embora.

A minha filha Manuela que merecia um diploma de Young Scientist, pois frequentou muitas disciplinas e horas de laboratório.

A prof. Dra. Maristela que nem longe desgrudamos dela e sempre nos lembramos das suas lições. A amiga e colega Fernanda Flores pela parceria, amizade e amostras de *Salmonella*, hehehe.

Aos meus amigos, que mesmo a distância, conseguiam arrancar risadas alegrando meus dias, Gustavo Henrique (estarei morta se ele ler isto), Lally, Simone, Vivi, Fran, Gaby, Lucimara, Lisi, Ana noivinha, Luana Maria e minha best Liziélle! Tanto desespero no telefone valeu a pena, né?

A Isamery por sua simpatia e carinho em todos os momentos.

Ao pessoal que passou um período curto aqui, mas deixaram saudade e ajudaram bastante, Ju (encontramos Jesus!), Ari, Dani, Mayara e Emanuele.

Agradeço a FAPESP, processo n° 2013/04365-3, pelo auxílio financeiro para realização do projeto. E a CAPES pela bolsa de doutorado que possibilitou a minha permanência (e da Manu) em Botucatu.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Amostras positivas para <i>Salmonella</i> Heidelberg obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.....	21
Tabela 2. Amostras positivas para <i>Salmonella</i> Enteritidis obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.....	22
Tabela 3. Amostras positivas para <i>Salmonella</i> Typhimurium obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.....	23
Tabela 4. Etapas realizadas no teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de <i>Salmonella</i> spp. em sobrecoxas de frango.	23
Tabela 5. Etapas realizadas no teste bacteriológico convencional, com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de <i>Salmonella</i> spp. em sobrecoxas de frango.....	24
Tabela 6. Etapas realizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de <i>Salmonella</i> spp. em sobrecoxas de frango.....	24

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores aproximados do custo por amostra, em real, dólar e euro, para três métodos de diagnóstico para <i>Salmonella</i> em amostras de alimento..	40
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA).	3
2.2 Bacteriófagos.....	4
2.3 Desafios no diagnóstico do gênero <i>Salmonella</i>	6
2.3.1 Separação Imunomagnética	8
2.3.2 Bacteriófagos para diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp.	9
3 CAPÍTULO 1 – Trabalho Científico 1 Técnica de Separação Imuno- magnética Associada a Bacteriófago para diagnóstico de sorovares de <i>Salmonella enterica</i> em carne de frango.	12
4 CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico 2 Custos de dois Métodos Rápidos e o Exame Bacteriológico Convencional para a Detecção de <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> em Carne de Frango.....	33
5 DISCUSSÃO GERAL	45
6 CONCLUSÕES GERAIS	49
7 BIBLIOGRAFIA.....	50

RESUMO

CORRÊA, I.M.O. **Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago para diagnóstico de *Salmonella enterica* em carne de frango.** Botucatu, 2015. 55p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Utilizou-se o método de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago para detectar os seguintes sorovares: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, em amostras de sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente. Para certificarmos da eficiência do método, comparamos esta técnica com os testes de diagnóstico usuais para este patógeno: a análise bacteriológica padrão, que inclui a etapa de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, realização de testes bioquímicos de triagem e sorologia, e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na avaliação da capacidade dos testes na detecção de *Salmonella* em carne de frango, submetemos amostras de sobrecoxas de frango à contaminação artificial com 5, 10 e 100 UFC/25mL de bactéria, para cada um dos sorovares listados anteriormente, totalizando 270 análises, divididas em 90 testes para cada um dos três sorovares, e assim comparamos os resultados obtidos com a análise bacteriológica, PCR e o teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. Ao aferirmos os resultados constatamos que a Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago é equiparável ao método bacteriológico recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e com a técnica de PCR, pois 99,6% das amostras foram positivas ao realizarmos o teste de Separação Imunomagnética associado a Bacteriófago e apenas uma amostra de *Salmonella* Enteritidis foi negativa neste ensaio, na concentração de 5 UFC/25mL. Já no método bacteriológico verificamos 95,5% de positividade, com nove amostras negativas para *S. Heidelberg*, duas negativas para *S. Enteritidis* e duas no ensaio com *S. Typhimurium*. Na técnica de PCR obtivemos 98,5% de positivos, com uma amostra negativa para *S. Enteritidis* na concentração de 5 UFC/25mL e três negativas para *S. Typhimurium*. O tempo despendido para a realização de

cada teste foi aferido e constatamos que a Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago foi o teste mais rápido para o diagnóstico de *Salmonella*, pois em aproximadamente 20 horas obtivemos o resultado, já a bacteriologia convencional demorou 88 horas e o PCR em torno de 44 horas. Com este estudo podemos confirmar a eficácia semelhante dos três métodos em relação à habilidade de detectar a presença deste patógeno, mesmo em baixas concentrações, em amostras de sobrecoxas de frango infectadas artificialmente, e a superioridade da Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago no quesito tempo de análise.

Palavras-chave: fago P22, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, teste rápido.

ABSTRACT

CORRÊA, I.M.O. **Immunomagnetic Separation Assay associated with Bacteriophage for *Salmonella enterica* diagnosis in poultry meat.** Botucatu, 2015. 55p. Thesis (Ph.D.) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

We used the Immunomagnetic Separation Assay associated with Bacteriophage to detect the following serovars: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium, in poultry drumstick samples artificially contaminated. We compared the efficiency of this technique to the usual diagnostic tests for *Salmonella* in food samples: the standard bacteriological analysis, which includes the step of pre-enrichment and selective enrichment, biochemical and serological screening tests, and polymerase chain reaction (PCR). To evaluate the tests capability of *Salmonella* detection poultry meat samples were submitted to artificial contamination with 5, 10 and 100 CFU/25mL of bacteria, for each of the serovars listed above, totaling 270 analyzes divided into 90 tests for each of the three serovars, and so compare the results obtained with the bacteriological analysis, PCR and Immunomagnetic Separation Bacteriophage assay. We found that the Immunomagnetic Separation Bacteriophage assay was comparable to bacteriological method recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) and the PCR technique, because 99.6% of the samples were positive to accomplish Immunomagnetic Separation Bacteriophage assay and only a sample of *Salmonella* Enteritidis was negative in this test, in the concentration of 5 CFU/25mL. The bacteriological method check 95.5% positivity, with nine samples negative for *S. Heidelberg*, two negative for *S. Enteritidis* and two in the test with *S. Typhimurium*. In PCR 98.5% positives samples were obtained, with one *S. Enteritidis* negative sample in the concentration of 5 CFU/25ml and three negative samples for *S. Typhimurium*. The time for performing each test was measured and the Immunomagnetic Separation Bacteriophage assay was the most rapid test for *Salmonella* diagnosis, since 20 hours, the conventional bacteriological took 88h and PCR

44h approximately. In this study we confirm the effectiveness of the three methods similar with respect to the ability to detect the presence of the pathogen, even in low concentrations in poultry drumsticks samples artificially infected.

Key words: phage P22, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, rapid methods.

1 INTRODUÇÃO

A salmonelose aviária é um termo que abrange grupos de doenças que podem ser causadas por qualquer bactéria do gênero *Salmonella*. O agente da pulorose, *Salmonella Pullorum*, e do tifo aviário, *Salmonella Gallinarum*, são classificados como hospedeiros específicos das aves e podem acarretar grandes perdas para a avicultura, mas devido à eficiência dos programas de biossegurança adotados essas são doenças controladas, ou erradicadas, em muitos países. Outros sorovares de *Salmonella* com potencial para causarem problemas para as aves, ou colonizá-las, são os causadores do paratifo aviário, estes sorovares estão presentes na cadeia avícola e ocorrem em diferentes tipos de criação no mundo inteiro. O sorovar Enteritidis, assim como Typhimurium, Heidelberg, Agona, Anatum, Hadar, Cubana e Senftenberg são comumente isolados de aves. Devido à capacidade de colonização do trato intestinal das aves sem causar sinais clínicos, os membros do grupo paratífico oferecem riscos à saúde pública uma vez que aumentam a contaminação da carcaça e ovos (ANDREATTI FILHO, 2007).

Infecções por bactérias do gênero *Salmonella* são causadoras de uma ampla gama de doenças agudas e crônicas em aves. Estas doenças acarretam perdas econômicas significativas para a grande maioria dos países, pois demandam dispendiosos investimentos em testes diagnósticos e medidas de controle e prevenção. Os plantéis de aves infectadas estão entre os principais reservatórios deste patógeno para o ser humano, através da transmissão pela cadeia alimentar por carne de frango e ovos contaminados. Este fato deve-se à elevada prevalência de infecção por *Salmonella* nas aves domésticas, ao crescente número de frangos e perus criados comercialmente e também aos extensivos programas de identificação de produtos avícolas e plantéis infectados (GAST, 2008).

A análise de 2.679 carcaças congeladas, provenientes de 15 capitais brasileiras, representativas de todas as cinco regiões geográficas do país, revelou a prevalência de 2,7% de amostras positivas para *Salmonella* spp., e destas 50,6% foram coletadas no estado de São Paulo. Os sorovares de maior

ocorrência foram *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* (MEDEIROS et al., 2011). Um dos principais desafios para a cadeia avícola consiste no diagnóstico deste patógeno, especialmente no quesito tempo de análise. O processo convencional para detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos é composto pelas seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meio sólido, reações bioquímicas e sorológicas. Desta forma o diagnóstico final pode demorar até cinco dias para sua conclusão (CUDJOE, 1999).

Uma alternativa a metodologia convencional de isolamento de *Salmonella* spp. é a utilização de bacteriófagos, pois os fagos apresentam a capacidade de infectar e se propagar em determinadas bactérias, aumentando a especificidade do teste. Além disso, os bacteriófagos se reproduzem dentro das células bacterianas alvo, necessitando de células viáveis o que aprimora a sensibilidade das análises. O desenvolvimento de testes rápidos torna-se favorável, porque os fagos líticos levam em torno de 1 – 2h para completar seu ciclo, desde o reconhecimento da célula alvo, penetração, lise da bactéria e liberação da progênie fágica (BROVKO; ANANY; GRIFFITHS, 2012).

Considerando as questões abordadas, relativas ao diagnóstico de *Salmonella* spp. em alimentos, o principal objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia do ensaio de Separação Imunomagnética associado a Bacteriófago frente aos demais testes já consagrados na rotina laboratorial sendo eles o exame bacteriológico convencional e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para tanto avaliamos a proporção de amostras positivas e negativas obtidas em cada teste. Também apresentamos outros quesitos de extrema importância para o diagnóstico deste patógeno, como o tempo necessário para a obtenção do diagnóstico final e os custos necessários para o desempenho dos testes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Em diversos países os surtos de infecções alimentares são associados com contaminações por *Salmonella* spp. (TIRADO; SCHMIDT, 2001). No Brasil a infecção humana por *Salmonella* Enteritidis emergiu no ano de 1993 como problema de saúde pública, e esta infecção foi correlacionada com o consumo de ovos crus ou mal cozidos. Entre os anos de 1995 a 2008 ocorreram 167 surtos por *S. Enteritidis* na região sudeste do estado de São Paulo, sendo a maionese caseira o principal alimento implicado com a infecção (SIMÕES et al., 2010). Ahmed e Shimamoto (2014) realizaram estudo de isolamento e caracterização molecular de três patógenos bacterianos analisando 800 amostras de produtos cárneos e outras 800 de produtos lácteos no Egito, o isolamento de *Salmonella* spp. em produtos cárneos correspondeu a 6,6% e em produtos de origem láctea a 4,3%, os autores descrevem que a incidência de *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7 e *Shigella* spp. foi maior nos produtos cárneos.

Salmonella spp. foi o principal micro-organismo identificado em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Rio Grande do Sul, pois foi isolada em 37% dos casos analisados nos anos de 2006 e 2007 (WELKER et al., 2010). Já outra pesquisa realizada no mesmo estado, demonstrou que a maioria dos surtos por *Salmonella* spp. teve a participação de produtos da cadeia avícola, destacando-se os alimentos preparados com ovos, em 72,2% dos surtos, e carne de frango em 11,4% dos casos (NADVORNY; FIGUEIREDO; SCHMIDT, 2004). Embora os ovos mal processados estejam associados à contaminação por *Salmonella* spp., Baú; Carvalho; Aleixo (2001) não encontraram ovos positivos em 94 amostras, já a análise de 124 produtos de frangos revelou 13 amostras contaminadas.

Estudo realizado no estado do Paraná, no qual se analisaram dados de DTA entre os anos de 1978 e 2000, as infecções por *Salmonella* spp. corresponderam à 33,4% das ocorrências, sendo o segundo micro-organismo relacionado com infecções alimentares nesse período superado apenas por

DTA causada por *Staphylococcus aureus*, e o ovo foi apontado como o alimento veiculador no caso de infecção por *Salmonella* spp. (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). Dos 2.541 sorovares de *Salmonella enterica* identificados até o momento, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* figuram entre os cinco sorovares mais isolados de fontes humanas nos Estados Unidos, correspondendo a 36% de todos os casos confirmados laboratorialmente (CDC, 2009). No ano de 2012 o sorovar *Heidelberg* figurava na nona posição e *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* continuavam nas primeiras colocações na lista dos sorovares associados com infecções humanas nos Estados Unidos (CDC, 2012).

No Brasil um estudo de prevalência de *Salmonella* em isolados de aves identificou com maior frequência os sorovares *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Infantis* durante o período de 1962 a 1991, o que representou de 65 – 67% dos casos (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). Um trabalho conduzido na região sul do Brasil avaliou a diversidade de sorovares de *Salmonella enterica* isolados de frangos e do ambiente de produção sendo o sorovar *S. Heidelberg* o principal associado a carcaças de frango (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2013). Historicamente, o isolamento de *Salmonella* em granjas avícolas é comum no Brasil, especialmente nos ovos, nas próprias aves e no ambiente de criação (ANDREATTI FILHO et al., 2001).

Devido a grande importância da identificação deste patógeno na cadeia de produtos de origem avícola, principalmente por sua importância na segurança alimentar dos consumidores, são necessários estudos que aperfeiçoem os métodos de detecção de *Salmonella* spp. nestas fontes.

2.2 Bacteriófagos.

Também chamados de fagos, são vírus que atacam bactérias e somente infectam e se multiplicam dentro de seus hospedeiros específicos. Os bacteriófagos podem provocar a lise do micro-organismo alvo ao afetar o metabolismo bacteriano, no caso de fagos líticos (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001). Os fagos são partículas infecciosas, como os outros vírus,

que apresentam um genoma de ácido nucléico cercado por subunidades de proteínas que formam o capsídeo. Acredita-se que o capsídeo desempenhe três funções no ciclo de vida do fago: proteger o genoma do bacteriófago, efetivar a ligação com a bactéria susceptível e ligação do genoma do fago com o citoplasma da bactéria infectada (GILL; ABEDON, 2003).

A maioria dos bacteriófagos contem DNA fita dupla (dsDNA) em seu genoma, mas também são descritos bacteriófagos com RNA fita simples (ssRNA), RNA fita dupla (dsRNA) e DNA fita simples (ssDNA). Acredita-se que esta diversidade de genomas pode ter sido essencial na evolução do ácido nucléico em organismos celulares (MADIGAN et al., 2011).

Os vírus bacterianos exercem papel fundamental na regulação do equilíbrio microbiano nos ecossistemas em que são encontrados. Estima-se que existam aproximadamente 1.031 fagos na biosfera, sendo assim considerados como a forma de vida mais abundante do planeta (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005). Os fagos podem ser classificados em dois tipos relacionados com a replicação dentro da célula bacteriana, os virulentos ou líticos e os fagos temperados ou lisogênicos. Fagos temperados possuem ciclo lisogênico, no qual incorporam o DNA ao genoma bacteriano, permanecendo integrados e replicam-se conforme a duplicação genômica da bactéria hospedeira, garantindo assim a capacidade de transferência para outra célula bacteriana (CHAMBERS; GONG, 2011).

Os fagos virulentos participam do ciclo lítico, no qual infectam a célula bacteriana inibindo o metabolismo do hospedeiro e induzindo a produção da progênie fágica. O ciclo lítico culmina na lise da bactéria e liberação de múltiplas partículas de fagos capazes de infectar novas células. O tempo total do ciclo dura entre 1 – 2h e o número de fagos produzidos é variável (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005). As etapas de ligação, penetração, latência, maturação e lise fazem parte do ciclo lítico da maioria dos fagos (BROVKO; ANANY; GRIFFITHS, 2012).

Antes da descoberta e da fabricação em larga escala dos antibióticos, foi proposto que a administração de bacteriófagos poderia prevenir ou ser usada como tratamento de infecções bacterianas. Apesar de algumas pesquisas comprovarem seus efeitos benéficos, o advento dos antibióticos fez com que os estudos fossem abandonados na maioria dos países. Entretanto, com o

aumento de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas, foi retomado o interesse pelo desenvolvimento de projetos relacionados com bacteriófagos (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001).

Os bacteriófagos possuem características favoráveis para a aplicação tanto na forma de tratamento quanto para diagnóstico, pois possuem alta capacidade de multiplicação, especificidade para agentes bacterianos e ausência de toxicidade, além de serem encontrados facilmente na natureza (GARCÍA; LÓPEZ, 2002).

2.3 Desafios no diagnóstico do gênero *Salmonella*.

É indispensável que o diagnóstico seja feito de forma rápida e eficaz para minimizar os riscos de transmissão entre os lotes e a contaminação de produtos para consumo humano. Várias fontes podem ser utilizadas para o isolamento e identificação de infecções paratíficas como: tecidos, órgãos e materiais oriundos do ambiente onde as aves vivem (cama aviária, suabes de arrasto, água de bebida e ração) (GAST, 2008).

A técnica oficial recomendada para pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos de origem animal, rações e ingredientes é por meio de exame bacteriológico com o isolamento e identificação do agente (BRASIL, 2003). Este método de diagnóstico, embora eficaz e confiável, apresenta limitações, podendo levar até cinco dias para a obtenção do resultado final (FLÔRES et al., 2001). Em alguns casos a sensibilidade do teste é afetada por tratamentos com antibióticos, coletas inadequadas e baixo número de micro-organismos viáveis, mesmo assim continua sendo preconizado pelas agências regulatórias em todo o mundo, pois são considerados “*gold standards*” (ZADERNOWSKA; CHAJĘCKA, 2012).

Em determinadas situações não é possível isolar a bactéria utilizando os métodos microbiológicos oficiais, pois ao compararmos *Salmonella* spp. com outros micro-organismos da mesma família notaremos que esta bactéria é pouco competitiva quando semeada em meios de cultura convencionais podendo ocorrer resultados falso-negativos, tornando-se um grande problema para a saúde coletiva (FLORES, 2011). A detecção de um patógeno específico

em uma amostra que contém inúmeras espécies de bactérias é um processo que demanda muito tempo, isto pode prejudicar o diagnóstico e tratamento de infecções bacterianas (CRANE; MARTIN; HIRSH, 1984).

Devido à possibilidade de contaminação por *Salmonella* spp. nos produtos de origem aviária, como carne e ovos, fez-se necessário o investimento em pesquisas de novos métodos que tornassem mais rápido, e ao mesmo tempo confiável, o diagnóstico final, buscando assim minimizar os riscos para o consumidor. Para verificar se os testes disponíveis comercialmente atendiam as exigências, foi realizado um levantamento bibliográfico e nenhum dos métodos correspondeu às exigências, principalmente em relação ao tempo de realização da análise (EIJKELKAMP; AARTS; VAN DER FELSKLERX, 2009).

Segundo Eijkelkamp; Aarts; Van Der Fels-Klerx (2009) testes rápidos para detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango devem ser desenvolvidos e aprimorados para aplicação em abatedouros de aves, pois a presença desta bactéria em carne fresca destinada ao consumo humano está proibida. Os principais critérios adotados na escolha de um teste rápido são: capacidade de detecção de até 1 UFC/25g, tempo de análise inferior à 24h, sensibilidade, especificidade e validação do método.

Pesquisas que visam o desenvolvimento de testes rápidos para a detecção de *Salmonella* estão sendo conduzidas, com o propósito de reduzir o tempo de análise e com potencial para automação. Um destes exemplos incluem *kits* ELISA que apesar das vantagens estão sujeitos a falhas na sensibilidade, pois comumente demandam 10^5 células alvo/mL para a detecção, além de requererem meios de enriquecimento tradicionais para que as bactérias alvo se multipliquem até níveis detectáveis pelo teste. Alguns testes rápidos podem sofrer interferência de micro-organismos competidores ou de *debris* alimentares. Os micro-organismos competidores também podem mascarar a detecção do patógeno alvo e também causar reações cruzadas, fornecendo resultados falso-positivos (BENNETT et al., 1997). Alguns constituintes dos alimentos podem inibir a amplificação do DNA alvo na reação de PCR (ROSSEN et al., 1992; LANTZ et al., 1994).

2.3.1 Separação Imunomagnética.

O ponto crítico na análise bacteriológica convencional para detecção de *Salmonella* spp. é o enriquecimento seletivo, pois pode inibir sorovares atípicos de *Salmonella* (CUDJOE, 1999). A aplicação de tecnologias de separação e concentração tem sido pesquisada para alcançar o isolamento e detecção em um curto período de tempo, mas com o máximo de confiabilidade. As técnicas de separação são capazes de separar os micro-organismos alvo de *debris* alimentares e de micro-organismos competidores. A técnica de concentração permite que a bactéria alvo seja suspendida em um pequeno volume, o que aumenta a concentração celular permitindo a detecção por métodos rápidos (BENNETT et al., 1997). A separação imunomagnética utiliza o princípio de atração das células bacterianas por anticorpos específicos impregnados em esferas magnéticas (*beads*). Então o complexo formado pode ser isolado de suspensões heterogêneas através da aplicação de um campo magnético. Após o isolamento, o complexo *bead*/bactéria é lavado em solução tampão para posterior transferência para o meio sólido seletivo de escolha, ou outros sistemas de detecção de *Salmonella* spp. A etapa de pré-enriquecimento é necessária, podendo ser breve (entre 5 – 6h) ou estendida (16 – 24h). Tratando-se de amostras com níveis elevados de bactérias contaminantes, como carne crua, pode-se submeter o complexo *bead*/bactéria ao enriquecimento seletivo aumentando a sensibilidade e especificidade do método (CUDJOE, 1999).

Comprovou-se que a separação imunomagnética com uso de Dynabeads® anti-*Salmonella* foi tão eficiente quanto os caldos de enriquecimento seletivo utilizados, Selenito – Cistina, Tetrationato Muller – Kauffmann e Rappaport – Vassiliadis, na rotina de isolamento de *Salmonella* spp., bem como a recuperação de células bacterianas injuriadas foi superior aos caldos de enriquecimento seletivo, reduzindo desta forma o número de resultados falsos negativos (MANSFIELD; FORSYTHE, 1996). Em outros trabalhos demonstrou-se que a separação imunomagnética pode ser empregada como alternativa ao método tradicional de enriquecimento seletivo, eliminando um período de incubação, o que diminui em 24h o tempo para o resultado final (CONCEIÇÃO et al., 2008; CUDJOE; KRONA; OLSEN, 1994).

Para comparar as técnicas de separação imunomagnética automatizada utilizando Dynabeads[®] anti-*Salmonella*, com o método convencional de cultivo bacteriológico, foram coletadas 240 amostras do ambiente avícola de granjas de poedeiras e inoculadas artificialmente. Os resultados comprovaram a similaridade entre os testes. Ambos apresentaram especificidade idêntica, mas a sensibilidade para detecção de *Salmonella* foi 15,5% mais elevada no método de separação imunomagnética. Outra vantagem descrita foi a diminuição do uso de meios seletivos (LYNCH et al., 2004).

2.3.2 Bacteriófagos para diagnóstico de *Salmonella* spp.

A extrema especificidade dos bacteriófagos fazem destes vírus bacterianos candidatos ideais tanto para desenvolvimento de testes diagnóstico de diversos patógenos, quanto para o aumento da segurança alimentar durante o processo de produção (HAGENS; LOESSNER, 2007).

O emprego de bacteriófagos em testes rápidos para diagnóstico de *Salmonella* spp. e outras enterobactérias, vem sendo explorado. A substituição de anticorpos por fagos em testes ELISA para a detecção de cepas bacterianas tem apresentado resultados promissores sendo capaz de detectar cepas específicas de *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* (GALIKOWSKA et al., 2011). Os fagos também podem ser empregados em técnicas que visem a separação e concentração de *Salmonella* em amostras de alimento. Pesquisa realizada por Bennett et al. (1997) demonstrou que o emprego de biosorbente específico para *Salmonella* utilizando bacteriófago foi capaz de remover as bactérias em meio de cultura fluído, além de separar *Salmonella* de suspensões que continham outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Uma das vantagens descritas encontra-se a facilidade de produção dos fagos, alta afinidade do fago pela bactéria alvo e a habilidade do bacteriófago em infectar as células alvo mesmo em ambientes heterogêneos.

Entre os métodos rápidos para diagnóstico de *Salmonella* spp. em alimentos o ensaio de separação imunomagnética utilizando bacteriófagos para detectar *Salmonella* Enteritidis, demonstrou ser uma técnica rápida, simples e sensível, além de detectar somente bactérias viáveis, não detectando bactérias

mortas por desinfetantes ou outros processos bactericidas (FAVRIN; JASSIM; GRIFFITHS, 2001). Este método utilizou partículas magnéticas revestidas por anticorpos policlonais anti-*Salmonella* para o isolamento das células bacterianas de interesse e posterior infecção destas por um bacteriófago lítico. A progênie fágica resultante deste ciclo foi recuperada e analisada com utilização de Sinal de Amplificação Celular (SAC), constituído de cultura pura de *Salmonella* spp. Nas amostras negativas o SAC se multiplicou devido ausência do bacteriófago e nas amostras positivas o crescimento do SAC foi retardado em relação às amostras negativas (FAVRIN; JASSIM; GRIFFITHS, 2003).

Favrin; Jassim; Griffiths (2003) contaminaram artificialmente carne de frango, leite em pó e carne moída com *Salmonella* Enteritidis e obtiveram êxito na detecção deste patógeno utilizando o método de separação imunomagnética associada ao bacteriófago lítico SJ2. O ensaio foi capaz de detectar até 3 UFC de *S. Enteritidis* em 25g ou mL de amostra e o tempo total de processamento, incluindo a etapa de pré-enriquecimento foi de 20h.

Estudo para detectar baixas concentrações de *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída, utilizou técnica semelhante à separação imunomagnética associada a bacteriófago, mas além de tratamento com fago foi realizada etapa com luciferina-luciferase (Fastr_{AK}TM). Um total de 74 isolados de *E. coli* foram previamente testados para análise de susceptibilidade ao fago de eleição, destes 53 foram susceptíveis ao bacteriófago. Então 15 cepas foram selecionadas para contaminação das amostras de carne (3 – 8UFC/25g), assim os autores encontraram apenas uma amostra negativa e sugeriram que um *pool* de bacteriófagos poderia aumentar a susceptibilidade das amostras de *E. coli* (KANNAN et al., 2010).

O ensaio de amplificação de bacteriófago é outro método em desenvolvimento para detecção de patógenos bacterianos. Esta técnica é baseada na especificidade dos fagos pelas células alvo, em conjunto com a utilização de agente virucida com potencial para destruir as partículas bacteriofágicas exógenas sem causar danos à bactéria. Os bacteriófagos que infectaram as células bacterianas estarão protegidos do agente virucida e continuarão a replicação. Devido à progênie fágica não ser imediatamente detectável foi recomendado adição de bactérias auxiliares para uma melhor

visualização das placas virais. O número de placas virais pode ser correlacionado com o número de células da amostra original, sendo considerada uma estimativa semi-quantitativa (MOLE et al., 1999).

Utilizou-se o teste de amplificação de bacteriófago para detectar isolados de *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, nesta técnica foi empregado extrato de casca de romã como agente virucida. Os dados obtidos demonstraram alta sensibilidade e obtenção do resultado em 4h (STEWART et al., 1998). Esta metodologia foi utilizada para diagnóstico de *Salmonella* Typhimurium em carne de frango e obtiveram-se resultados positivos, com a observação de placas virais que indicaram a presença de células de *S. Typhimurium* nas amostras avaliadas e posterior correlação com o exame bacteriológico convencional que constatou a presença de colônias típicas e confirmação sorológica destas (SIQUEIRA; DODD; REES, 2003).

3 CAPÍTULO 1 – Trabalho Científico 1

“Trabalho a ser enviado para a revista Applied and Environmental Microbiology”

Técnica de Separação Imunomagnética Associada a Bacteriófago para diagnóstico de sorovares de *Salmonella enterica* em carne de frango.

RESUMO

Utilizamos o método de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago para detecção dos seguintes sorovares de *Salmonella*: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg (S. Heidelberg), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (S. Enteritidis) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (S. Typhimurium), em amostras de sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente com 5, 10 e 100 UFC/25mL de bactéria. Para certificarmos da eficiência do método, comparamos esta técnica com os testes de diagnóstico usuais para este patógeno: a análise bacteriológica padrão, que inclui a etapa de enriquecimento seletivo, realização de testes bioquímicos de triagem e sorologia, e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Com este estudo confirmamos a eficácia do teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, pois foi capaz de detectar 99,6% das amostras positivas para *Salmonella* destes três sorovares testados.

INTRODUÇÃO

Salmonellas do grupo paratífico figuram como um dos principais patógenos envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos, também são a principal causa de hospitalização (35%) e morte (28%) devido o consumo de produtos contaminados nos Estados Unidos (1). Dos 2.541 sorovares de *Salmonella enterica* identificados até o momento, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg (*S. Heidelberg*) estão entre os cinco sorovares mais isolados de fontes humanas nos Estados Unidos, correspondendo a 36% de todos os casos confirmados laboratorialmente (2). Na região de Washington (EUA) a porcentagem de amostras positivas para *Salmonella* foi de 3% e a carne de frango apresentou a maior taxa de contaminação (4,2%) (3). A prevalência de *Salmonella* em carne de frango na Colômbia foi estimada em 27% em estudo que envolveu a análise de diversos fatores, como tipo de produção de frango e condições de estocagem (4). No Brasil a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango foi de 2,7% e os principais sorovares identificados foram *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* (5). Na região nordeste do Brasil 9,6% das carcaças de frango avaliadas bacteriologicamente foram positivas para este patógeno (6). Já no estado de São Paulo estudo detectou 2,5% de amostras positivas para *Salmonella* em carcaças de frango industrialmente processadas no ano de 2008 (7), em contrapartida outra pesquisa realizada no ano 2000 no mesmo estado, com carcaças de frango congeladas, detectou 32% de amostras positivas (8).

Historicamente, o isolamento de *Salmonella* em granjas avícolas é comum no Brasil, especialmente nos ovos, nas próprias aves e no ambiente de criação (9). O método bacteriológico preconizado para diagnóstico de *Salmonella* spp. é trabalhoso, além de requerer entre 4 a 5 dias para o diagnóstico final, então o desenvolvimento de testes rápidos é simples torna-se essencial para o diagnóstico e controle (10). O diagnóstico tradicional para determinar a sanidade dos alimentos continuará em uso por um longo período de tempo por ser uma técnica consagrada e eficiente, embora demorada. As técnicas moleculares estão sendo utilizadas com uma maior frequência na

rotina laboratorial e em conjunto com as técnicas tradicionais proporciona diagnósticos mais precisos em um período de tempo inferior (11). Mesmo assim há a necessidade de investimento em pesquisa para desenvolver ou aprimorar testes rápidos para detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango, buscando assim minimizar os riscos para o consumidor (12).

Os bacteriófagos possuem características favoráveis ao emprego em testes de diagnósticos de patógenos bacterianos, entre elas podemos citar a alta capacidade de multiplicação, especificidade para agentes bacterianos e ausência de toxicidade, além de serem encontrados facilmente na natureza (13).

Com este estudo pretendemos avaliar a viabilidade de aplicação do teste de Separação Imunomagnética associado a bacteriófago para a análise de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg, em carne de frango. Para isso contaminamos artificialmente sobrecoxas de frango com três dosagens diferentes de inóculo bacteriano, e concomitantemente a este teste, também analisamos a carne de frango através do exame bacteriológico convencional e reação de PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas. Um total de 30 amostras bacterianas de cada sorovar, sendo estes, *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (S. Heidelberg), *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (S. Enteritidis) e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (S. Typhimurium), totalizando 90 cepas bacterianas distintas, foram utilizadas para contaminar artificialmente sobrecoxas de frango. As sobrecoxas foram submetidas a análises bacteriológicas convencionais que incluíam testes bioquímicos de triagem e sorologia, ao teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e a técnica de PCR. As cepas bacterianas eram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ/UNESP, estavam estocadas em ágar nutriente (AN; HiMedia, Mumbai, Índia), refrigeradas a 4°C e foram previamente sorotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz/SP.

Preparo do inóculo bacteriano. Para determinação do inóculo utilizamos o método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), realizando a técnica de *spread-plate*, que consiste em diluições seriadas e plaqueamento em ágar sólido. Utilizamos 10mL de caldo *Tryptone Soya Broth* (TSB; HiMedia, Mumbai, Índia), no qual foi adicionado entre 3 – 5 colônias puras, em fase estacionária de crescimento, da amostra desejada, para então realizar-se as diluições em série, em solução salina fosfatada tamponada (PBS) até 10^{-5} e plaqueamento em Ágar Verde Brilhante (AVB; Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas a 37° era realizada a contagem das colônias. Nesse período mantinha-se o inóculo refrigerado a 4°C para impedir que as bactérias se multiplicassem. Então o inóculo bacteriano era diluído para alcançar as seguintes concentrações: 5, 10 e 100 UFC/25mL e nova contagem realizada, como descrito anteriormente.

Preparo das amostras. Sobrecoxas de frango, adquiridas na rede de supermercados do município de Botucatu/São Paulo, foram pesadas em balança analítica e separadas em porções de 25g. As 25g eram acondicionadas em *stomacher bag*, estéreis e com filtro total, então foram

adicionados 225mL de TSB para proceder-se com a mistura em homogeneizador de amostras tipo *Stomacher*, durante 2 minutos. Após, alíquotas de 25mL do homogeneizado foram transferidas, para tubos tipo Falcon de 45mL estéreis e inoculadas com *Salmonella*. Para cada amostra bacteriana prepararam-se três concentrações de inóculo, sendo elas: 5, 10 e 100 UFC as quais foram inoculadas nos 25mL do homogeneizado das sobrecoxas de frango. Com isto o total de análises para cada sorovar bacteriano foi de 90 testes e o total geral, incluindo todos os três sorovares, foi de 270 análises.

Etapas de enriquecimento. Esta etapa foi comum para todos os testes realizados e constituiu-se da adição dos 25mL do homogeneizado inoculado em 250mL de caldo TSB suplementado com 20µg/mL de novobiocina (Inlab, Diadema, SP, Brasil), e incubação durante 16h a 37°C em estufa bacteriológica.

Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. Este teste é composto de quatro fases distintas: captura, ligação e amplificação, incubação e detecção, e foi realizado como descrito por Favrin, Jassim, Griffiths (14), com algumas modificações.

Amostras controle. Em todas as análises foram incluídas amostras controle positivo, constituídas por cultura pura de *Salmonella* Typhimurium em caldo TSB submetida a todas as fases do ensaio citadas. Os controles negativos utilizados foram: cultura pura de *Escherichia coli* em caldo TSB e uma alíquota do lavado das sobrecoxas de frango não inoculada com *Salmonella*, sendo esta amostra submetida a todas as fases descritas anteriormente.

Bacteriófago. O fago de eleição para este estudo foi o bacteriófago lítico P22 (ATCC 19585B1). Antes de cada ensaio, o fago foi amplificado em cultura pura de *Salmonella* Typhimurium cultivada em caldo TSB 2X em estufa bacteriológica a 37°C, 2mL deste cultivo foi adicionado em 5mL de caldo TSB juntamente com 1mL do fago em fase estacionária, após 12h de incubação a

37°C procedeu-se a centrifugação das amostras por 10 minutos a $7.000 \times g$, posteriormente o sobrenadante foi filtrado com auxílio de filtro de seringa de $0.22\mu\text{m}$ *Minisart* (Sartorius Intec, Goettingen, Alemanha) e a solução resultante estocada a 4°C. Para a quantificação do bacteriófago amplificado utilizou-se o ensaio em placa, onde se realizaram diluições seriadas do fago até 10^{-10} , então 100 μL do fago diluído foi acrescentado a 300 μL de seu hospedeiro bacteriano susceptível, no caso uma amostra de *Salmonella* Typhimurium em fase de crescimento exponencial, e após 15 minutos desta etapa de pré-adsorção, a suspensão fago/bactéria foi adicionada em tubos contendo 5mL de soft *Soyabean Casein Digest Agar* (TSA; HiMedia, Mumbai, Índia) e vertidas em placas aquecidas de TSA. Após 18 - 24h de incubação a 37°C procedeu-se com a contagem das placas virais e determinação da concentração do fago na amostra (15,16).

Captura. Aliquotas de 1mL do caldo de enriquecimento foram acrescentadas em microtubos, juntamente com 20 μL de esferas magnéticas de anticorpo (Dynabeads[®] anti-*Salmonella*, AppliedBiosystemsTM, Foster City, CA, Estados Unidos). Então as alíquotas foram submetidas à rotação em *mixer* durante 30 minutos (Dyna[®] MX4 mixer, Invitrogen, Oslo, Norway) em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram transferidas para separador de partículas magnéticas (Dyna[®] Magnetic Particle Concentrator[®] MPC-S, Invitrogen, Oslo, Norway) durante 3 minutos, onde ocorreu a separação dos *beads* do caldo de enriquecimento. O sobrenadante foi aspirado e descartado e as esferas magnéticas lavadas duas vezes em solução tampão de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) *Tween*-80 (PBST; [100mL de PBS 10x, 1,37M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄; 900mL de água destilada estéril e 5mL de *Tween*80]) a 0,1% e suspensos em 250 μL de TSB.

Ligação e amplificação. Foi adicionado aos microtubos 100 μL do bacteriófago P22, com aproximadamente 10^8 PFU/mL, e procedeu-se com incubação em estufa bacteriológica durante 10 minutos a 37°C. Em amostras positivas é nesta etapa em que ocorre a ligação do bacteriófago com os *beads*. Após a incubação as partículas magnéticas foram novamente transferidas para o MPC-S[®] e lavadas com solução de PBST, para a remoção dos fagos não

ligados. Suspenderam-se os *beads* em 100µL de TSB e incubou-se por 30 minutos a 37°C para a liberação da progênie fágica.

Incubação e Detecção. Nesta fase foi adicionado, em um novo microtubo, o sobrenadante de todas as amostras acrescido de 1mL do Sinal de Amplificação Celular (SAC). Nesta última etapa a progênie fágica e o SAC foram incubados durante 2h a 37°C, para que pudéssemos identificar a expressão da lise nas amostras positivas.

Sinal de Amplificação celular (SAC). O SAC era constituído por uma cultura pura de *Salmonella* Typhimurium, em caldo TSB incubado por 20h a 37°C. Este caldo foi submetido à leitura em espectrofotômetro e realizaram-se diluições para que obtivéssemos, em todas as leituras, a densidade óptica de aproximadamente 0,075 quando lido em 600nm.

Leitura dos resultados. Para a leitura dos resultados transferimos 1mL do caldo para uma cubeta plástica descartável e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (GeneQuantTMpro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra, UK). Consideramos positivas as amostras que apresentaram uma densidade óptica 70% menor que a média dos valores obtidos nas amostras controle negativas. Estes valores foram estabelecidos em estudos realizados por outros pesquisadores (14).

Análise Bacteriológica. Foram adicionados 1000µL do caldo de enriquecimento em caldo Tetrationato (Acumedia, Lansing, Michigan, Estados Unidos), acrescido de 200µL de solução de iodo e 100µL verde brilhante, para o caldo Rappaport-Vassiliadis (Acumedia, Lansing, Michigan, Estados Unidos) foi utilizado 100µL do caldo de enriquecimento, após incubação de ambos em estufa bacteriológica por 24h a 41°C, os caldos de enriquecimento seletivo foram estriados em placas de AVB e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD; Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e incubados a 37°C durante 24h. As placas que apresentaram colônias com morfologia semelhante à *Salmonella* spp. eram selecionadas para realização de triagem bioquímica, constituída dos seguintes meios: Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI; HiMedia,

Mumbai, Índia), Ágar Lisina Ferro (LIA; Difco, Maryland, Estados Unidos), caldo Ureia (Difco, Maryland, Estados Unidos), meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM; HiMedia, Mumbai, Índia) e Citrato de Simmons (Difco, Maryland, Estados Unidos). Posteriormente as amostras foram submetidas ao teste de soroaglutinação com antissoro polivalente “O” para *Salmonella* (PROBAC DO BRASIL, São Paulo, SP, Brasil). Consideramos positivas as colônias com morfologia semelhante à *Salmonella* e que apresentassem bioquímico de triagem correspondente a esta bactéria, bem como reação positiva no teste de soroaglutinação com antissoro polivalente “O”.

Extração do DNA. As alíquotas utilizadas para PCR foram obtidas na etapa de enriquecimento seletivo para *Salmonella* durante o processamento destas na análise bacteriológica, foram acondicionados 1000µL do caldo Rappaport-Vasidialis em microtubos de 1,5mL livres de DNase, RNase e pirogênios e congelados a - 20°C para posterior análise. O DNA das amostras foi extraído por tratamento térmico. O protocolo consistiu de três lavagens com 1mL de PBS seguidas por centrifugação a $8.000 \times g$ durante 5min a 10°C e após a última lavagem o pellet era ressuspensionado em 600µL de TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA, pH 8.0) e aquecido em banho-maria 95°C durante 10min. Por fim centrifugado a 8000rpm durante 5min a 10°C, sendo coletado 200µL do sobrenadante e armazenado -20°C (17,18).

Técnica de PCR. Para a reação foi utilizado o primer para o gene *invA* (Fw: 5'-TTGTTACGGCTATTTTGACCA – 3' ; Rv: 5'-CTGACTGCTACCTTGCTGATG –3') (19) na concentração de 20pmol/µL. Para amplificação no volume final de 25µL, contendo 5µL de cada amostra, 1µL de cada primer, 12.5µL do *mix* de amplificação Go Taq® Green Master Mix (PROMEGA, Madison, USA), e 5.5 µL de água ultrapura. A mistura foi processada no termociclador (Eppendorf AG Mastercycler Gradient) consistindo de: 5 min a 94°C, 35 ciclos de amplificação (30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C) seguido de extensão final por 4 min a 72°C (20).

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com GelRed (BIORAD) e a visualização realizada com auxílio de

transiluminador. Foram considerados positivos os produtos resultantes com tamanho esperado de 521pb.

Análise Estatística. Utilizamos o teste de associação de Goodman complementado com as comparações múltiplas entre populações binomiais (21), considerando o nível de 5% de significância.

RESULTADOS

***Salmonella* Heidelberg.** Todas as amostras deste sorovar utilizadas para contaminar artificialmente sobrecoxas de frango foram identificadas como positivas pelo método de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e também pela reação de PCR. Ao realizarmos a pesquisa bacteriológica, 81 amostras (90%) foram positivas. Os resultados obtidos em cada concentração inoculada estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras positivas para *Salmonella* Heidelberg obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.

Concentração de S. Heidelberg	Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago	Bacteriológico	PCR
5 UFC/25mL	30	27	30
10UFC/25mL	30	25	30
100 UFC/25mL	30	29	30
Porcentagem de Positivos	100%	90%	100%

***Salmonella* Enteritidis.** As sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente com *Salmonella* Enteritidis exibiram o mesmo padrão na análise por PCR e Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, pois obtivemos 89 amostras positivas (98,8%) nos dois testes e a única amostra negativa, em ambos os testes, correspondeu a concentração de 5 UFC/25mL. Já no exame bacteriológico convencional encontramos 88 amostras positivas (97,7%), sendo as negativas detectadas nas concentrações de 100 e 5 UFC/25mL (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras positivas para *Salmonella* Enteritidis obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.

Concentração de S. Enteritidis	Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago	Bacteriológico	PCR
5 UFC/25mL	29	29	29
10 UFC/25mL	30	30	30
100 UFC/25mL	30	29	30
Porcentagem de Positivos	98,8%	97,7%	98,8%

***Salmonella* Typhimurium.** No experimento realizado com *Salmonella* Typhimurium constatamos uma maior detecção das amostras positivas ao executar o teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago em comparação com os outros testes, uma vez que através dele fomos capazes de determinar a presença de todas as 90 amostras positivas (100%). Já no teste de PCR encontramos 87 amostras positivas (96,6%), sendo uma negativa na concentração de 10 UFC/25mL e duas no inóculo de 5 UFC/mL. Na análise dos resultados obtidos pelo exame bacteriológico convencional verificamos 88 amostras positivas (97,7%), as duas amostras negativas estavam distribuídas nas concentrações de 100 e 5 UFC/25mL (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras positivas para *Salmonella* Typhimurium obtidas nos testes: Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, Teste Bacteriológico e PCR utilizando três concentrações de inóculo em sobrecoxas de frango contaminadas artificialmente.

Concentração de <i>S. Typhimurium</i>	Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago	Bacteriológico	PCR
5 UFC/25mL	30	29	28
10 UFC/25mL	30	30	29
100 UFC/25mL	30	29	30
Porcentagem de Positivos	100%	97,7%	96,6%

Tempo total de diagnóstico final. A metodologia que combina a Separação Imunomagnética com o bacteriófago P22 foi capaz de detectar a presença de células viáveis de *Salmonella* em sobrecoxas de frango em aproximadamente 19 horas, incluindo a etapa de enriquecimento (Tabela 4).

Tabela 4. Etapas realizadas no teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de *Salmonella* spp. em sobrecoxas de frango.

Etapa	Tempo Decorrido
Enriquecimento	16 horas
Captura	35 minutos
Ligação e Amplificação	40 minutos
Incubação e Detecção	2 horas
Tempo Total	19h15min

No teste bacteriológico o tempo total para diagnóstico final foi de aproximadamente 88 horas, incluindo as etapas de enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em ágar sólido, triagem bioquímica e sorologia (Tabela 5).

Tabela 5. Etapas realizadas no teste bacteriológico convencional, com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de *Salmonella* spp. em sobrecoxas de frango.

Etapa	Tempo Decorrido (horas)
Pré – Enriquecimento	16
Enriquecimento Seletivo	24
Plaqueamento em meios sólidos	24
Bioquímico de Triagem e Sorologia	24
Tempo Total (horas)	88

Na técnica de PCR o diagnóstico de *Salmonella* spp. foi realizado em aproximadamente 43 horas, pois foi necessário incluir a etapa de enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassidilis para melhor detecção das amostras positivas (Tabela 6).

Tabela 6. Etapas realizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), com o respectivo tempo de duração para o diagnóstico final de *Salmonella* spp. em sobrecoxas de frango.

Etapa	Tempo Decorrido
Enriquecimento	16 horas
Enriquecimento Seletivo	24 horas
Extração DNA	1 hora
Reação de PCR	2 horas
Eletroforese	40 minutos
Tempo Total	43h40min

Não houve diferença estatística significativa ao analisarmos a capacidade de detecção dos três sorovares de *Salmonella* pelo ensaio de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, bacteriológico convencional e PCR.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico de patógenos alimentares é essencial para a segurança alimentar e atendimento da demanda crescente de produtos de origem animal, principalmente de carne de frango e seus subprodutos. Para verificar se os testes disponíveis comercialmente atendiam as exigências, foi realizado um levantamento bibliográfico e nenhum dos métodos correspondeu às exigências, principalmente em relação ao tempo de realização da análise (12). No teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago constatamos uma diminuição substancial no tempo para obtenção do resultado final, superando inclusive o tempo necessário para a realização do diagnóstico por PCR.

O método de Separação Imunomagnética associado a Bacteriófago foi proposto por Favrin e colaboradores, utilizando o fago lítico SJ2 para detectar *Salmonella* em caldo. O teste detectou com eficiência as cepas do sorogrupo D de *Salmonella* Enteritidis sem apresentar reação cruzada com outros sorogrupos, com exceção de uma cepa de *Salmonella* Typhimurium, as principais vantagens encontradas neste ensaio foram a rapidez, sensibilidade, especificidade e a facilidade de execução (14). Em outro experimento os autores utilizaram o ensaio de Separação Imunomagnética associado a Bacteriófago para detectar *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de alimentos artificialmente contaminados com um sorovar de cada bactéria em diferentes concentrações de inóculo. Todos os alimentos contaminados com *Salmonella* Enteritidis, que incluíam leite em pó desnatado, frango e carne moída, foram detectáveis pelo teste inclusive nas menores concentrações de inóculo que eram de aproximadamente 2 – 3 UFC/mL ou g (22).

O bacteriófago de eleição para a realização do ensaio de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago foi o fago P22, pois possui atividade lítica contra diferentes sorovares de *Salmonella*, entre eles *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*, tendo sua ação comprovada em ensaios de detecção deste patógeno em alimentos (23). O bacteriófago P22 reconhece o antígeno O na membrana lipopolissacarídica externa de sorovares de *Salmonella* que pertencem aos sorogrupos A, B e D1 (24). Com este

experimento podemos comprovar a ação do fago P22 nos três sorovares de *Salmonella* empregando-se o teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, pois todas as concentrações de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium analisadas foram positivas neste ensaio. Apenas uma amostra, na menor concentração (5 UFC/25mL), de *Salmonella* Enteritidis foi negativa. Estes resultados comprovam a capacidade do teste em detectar até mesmo baixíssimas concentrações de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango contaminadas artificialmente e com a presença de flora bacteriana competitiva.

Com relação à etapa de incubação e detecção do teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago na qual acrescentamos uma cultura pura de *Salmonella* Typhimurium, denominada SAC, reiteramos que o Sinal de Amplificação Celular é essencial para a recuperação da progênie fágica, pois ao adicionarmos uma cultura com células saudáveis de *Salmonella* o bacteriófago irá expressar amplamente seu poder lise, sendo detectado pela determinação da densidade óptica. Em resumo, na leitura dos resultados por espectrofotômetro as amostras positivas apresentam decréscimo na densidade óptica, uma vez que o fago se ligou nos *beads* impregnados com *Salmonella* e expressou seu ciclo lítico ao ser exposto a uma nova cultura bacteriana (SAC). Já nas amostras negativas, detectamos uma elevada densidade óptica, pois não houve *Salmonella* ligada aos *beads*, então o bacteriófago não se ligou às partículas magnéticas e foi removido com as lavagens. Assim, ao adicionar o SAC, não havia fagos capazes de combater as novas células de *Salmonella* presentes no SAC.

Na análise por PCR também detectamos todas as 90 amostras de *Salmonella* Heidelberg inoculadas, já no sorovar Enteritis identificamos uma amostra negativa, na concentração de 5 UFC/25mL, sendo esta a mesma cepa que não foi detectada no ensaio de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. No método de PCR para *Salmonella* Typhimurium encontramos 87 porções de sobrecoxas de frango positivas e três negativas, das quais duas das amostras negativas foram da concentração de inoculação mais baixa (5 UFC/25mL) e uma pertencia a inoculação de 10 UFC/25mL. As 90 sobrecoxas, representantes dos três sorovares testados, inoculadas com a concentração de 100 UFC/25mL foram identificadas como positivas no ensaio de PCR. Estudo

realizado para comparar a detecção de *Salmonella* spp. entre as técnicas de exame microbiológico padrão e a reação de PCR combinada com enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis, também detectou três amostras negativas para *Salmonella*, sendo uma do sorovar Typhimurium, no PCR e estas foram positivas no teste bacteriológico, mesmo assim a técnica de PCR detectou 54 amostras positivas, e o exame bacteriológico apenas 42 (25). Em estudo de validação multicêntrica da acurácia do método de PCR para *Salmonella* os pesquisadores encontraram alguns isolados não detectáveis pelo PCR e atribuíram este fato a uma possível degradação parcial da amostra de DNA por atividade de DNase, pois a extração de DNA utilizada foi pelo método de lise térmica das células (26). Acreditamos que as quatro amostras negativas obtidas no PCR ocorreram devido à degradação do DNA e também a baixa concentração do patógeno na amostra, pois três amostras pertenciam a menor concentração de inóculo (5 UFC/25mL) e uma na concentração intermediária (10 UFC/25mL). Os mesmos isolados negativos nessas concentrações citadas foram positivos para as outras concentrações testadas, o que reforça a hipótese descrita anteriormente, e o fato de todas as amostras com concentração de 100 UFC/25mL terem sido detectáveis pelo método de PCR.

No exame bacteriológico convencional para *Salmonella* Heidelberg (90%) apenas 81 amostras foram positivas e nos sorovares Typhimurium e Enteritidis o número de positivos foi o mesmo, 88 amostras (97,7%). No total detectamos 13 amostras negativas, sendo estas mesmas cepas recuperadas como positivas no PCR e pela Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. Estudo comparativo entre a técnica de PCR e o exame bacteriológico convencional para detecção de *Salmonella* em ovos não encontrou diferença estatística entre os dois métodos, além disso, o PCR pode detectar duas amostras a mais que o exame bacteriológico (27). Outro estudo comparou as técnicas de PCR, ensaio imunoenzimático (ELISA) com o método bacteriológico convencional, para isso contaminou artificialmente 300 amostras de carcaças de frango e compararam os resultados de cinco laboratórios, o método bacteriológico recuperou o menor número de amostras totalizando 170 (56,67%), enquanto o ELISA e PCR recuperaram respectivamente 213 (71%) e 225 (75%) das amostras avaliadas. Os autores afirmaram que estas técnicas

foram superiores na detecção de *Salmonella* em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas recomendando-as como testes de triagem, pois detectam mais rapidamente as amostras negativas, mas reiterando que o isolamento do agente é necessário para sorotipificação dos isolados (28). A acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo de dois métodos de cultura e PCR para detecção de sorovares móveis e não-móveis de *Salmonella* foi estimada em estudo utilizando ração para aves contaminada artificialmente e encontrou resultados similares para os sorovares móveis de *Salmonella*, já para os sorovares imóveis de *Salmonella* o teste de PCR melhorou os parâmetros avaliados (29).

Com relação ao tempo total para análise das sobrecoxas de frango, a Separação Imunomagnética Associada a bacteriófago apresentou os melhores resultados, pois o tempo do ensaio foi de 20h incluindo a etapa de pré-enriquecimento, sendo o mesmo tempo relatado por outro trabalho (22). Já outros testes rápidos utilizando bacteriófagos, que não incluíam a etapa de pré-enriquecimento, obtiveram resultados entre 4 – 5h (14, 23, 30). Em nosso trabalho optamos por incluir a etapa de enriquecimento por não estarmos trabalhando com culturas puras que não sofrem a interferência de flora bacteriana competitiva, simulamos a situação real encontrada na rotina bacteriológica que recebe amostras de campo, na maioria das vezes com flora mista bacteriana e células injuriadas, fazendo-se necessária a inclusão do pré-enriquecimento para recuperar as células lesadas e aumentar a concentração bacteriana a níveis detectáveis nos testes, caso a amostra apresente baixos níveis de contaminação.

Com a técnica de PCR em 44h obtivemos o resultado, a inclusão da etapa de enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassidilis foi necessária devido à baixa concentração do inóculo de *Salmonella* e presença de bactérias competidoras nas amostras. Alguns autores relatam que um dos limitantes para a técnica de PCR é a inibição da enzima Taq polimerase pelos componentes presentes em amostras de alimentos e a presença de baixo número de bactérias alvo por grama de alimento (31). O exame bacteriológico foi o método com maior tempo de análise encontrado, pois o resultado final foi obtido com 88h. O exame bacteriológico é considerado no mundo todo como *gold standard* para a detecção de *Salmonella* em amostras de alimentos para consumo

humano e para a alimentação animal, cada local segue sua própria legislação para o isolamento deste patógeno, por exemplo, ISO 6579:2002 ou *European gold standard* (DIN EN 12824:1998), mas as etapas principais para detecção de *Salmonella* em alimentos são basicamente as mesmas: pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, isolamento em ágar sólido seletivo e confirmação bioquímica e sorológica. O tempo gasto em cada legislação adotada é variável, bem como os meios líquidos e sólidos empregados, um resultado positivo seguindo a metodologia da ISO 6579:2002 pode levar até seis dias, enquanto pela metodologia preconizada pela DIN EN 12824:1998 o resultado será obtido em oito dias, já os resultados negativos poderão ser emitidos entre quatro e seis dias (32, 33, 34).

Com estes resultados podemos concluir que os testes possuem excelente equivalência em relação à detecção de amostras positivas de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium em carne de frango. O ensaio de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago foi o método mais rápido para obtenção do diagnóstico final, 20h, tornando-se aplicável para utilização na rotina laboratorial como teste de triagem.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo 2013/04365-3, pelo auxílio financeiro para a realização dos experimentos. E a CAPES pela concessão de bolsa de doutorado para Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa.

REFERÊNCIAS

1. **Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM.** 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis* 1 – 21. doi: 10.3201/eid1701.P11101.
2. **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).** 2009. National Salmonella surveillance annual summary 2009. 96p. Disponível em:

- <<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/SalmonellaAnnualSummaryTables2009.pdf>>. Acesso em: 10 de ago. de 2015.
3. **Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White DG, Wagner D, Meng J.** Dec. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Appl Environ Microbiol* 67: 5431 – 5436 doi: 10.1128/AEM.67.12.5431–5436.2001.
 4. **Donado-Godoy P, Clavijo V, León M, Tafur Mc A, Gonzales S, Hume M, Alali W, Walls I, Wong DMALF, Doyle MP.** 2012. Prevalence of *Salmonella* on Retail Broiler Chicken Meat Carcasses in Colombia. *J Food Protect* 75: 1134 – 1138 doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-513.
 5. **Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodriguez DP, Freitas DRC.** 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica* 30: 555 – 560, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892011001200010>
 6. **Duarte DAM, Ribeiro AR, Vasconcelos AMM, Santos SB, Silva JVD, Andrade PLA, Falcão LSPCA.** 2009. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz. J. Microbiol.* 40: 569 – 573. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000300020>.
 7. **Tessari ENC, Cardoso ALSP, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Luciano RL, Castro AGM.** 2008. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. *Cienc. Rural* 38: 2557 – 2560. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008005000011>.
 8. **Santos DMS, Berchieri Junior A, Fernandes SA, Tavechio AT, Amaral LA.** 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq. Vet. Bras.* 20: 39 – 42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2000000100005>.
 9. **Andreatti Filho RL, Fernandes SA, Boretti LP, Barros MR, Del Bem SR, Fontana A, Sampaio HM, Savano EN.** 2001. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. *Rev Educ Contin CRMV - SP* 4: p.90 –101.
 10. **Alcocer I, Oliveira TCRM.** 2003. Detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23: 401 – 408.
 11. **Andrade RB, Gemelli T, Dall Onder LP, Cristina K, Brito T., Barboza AAL, Brito BG.** 2010. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* *Arq. Inst. Biol.* 77: 741 – 750.
 12. **Eijkelkamp JM, Aarts HJM, van der Fels-Klerx HJ.** 2009. Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses *Food Anal. Methods* 2: 1–13 DOI 10.1007/s12161-008-9040-5.

13. **García E, López R.** 2002. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos Rev Esp Quimioter.15: 306 – 312
14. **Favrin S.J, Jassim SA, Griffiths MW.** 2001. Development and optimization of a novel Immunomagnetic Separation-Bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. Appl Environ Microbiol. 67: 217 – 224 doi: 10.1128/AEM.67.1.217-224.2001.
15. **Panec M, Katz DS.** 2006. Plaque Assay Protocols. ASM MicrobeLibrary. Acesso em 10 de ago. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3073-plaque-assay-protocols>
16. **Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM.** 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. Poultry Sci. 86: 1904 – 1909 doi: 10.1093/ps/86.9.1904
17. **Fadl AA, Nguyen AV, Khan MI.** 1995. Analysis of *Salmonella* enteritidis isolates by arbitrarily primed PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 987 – 989.
18. **Andreatti Filho RL, Gonçalves GAM, Okamoto AS, Lima ET.** 2011. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos avícolas. Ci. Anim. Bras. 12: 115 – 119 doi: 10.5216/cab.v12i1.3774
19. **Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW.** 1996. Virulence determinants invA and spvC in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3768 – 3771.
20. **Marietto-Gonçalves GA, Lima ET, Donato TC, Rocha TS, Álvarez LEC, Sequeira JL, Andreatti Filho RL.** 2011. Eradication of *Salmonella* Typhimurium in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. Microbiol Res. 3: e2. doi: <http://dx.doi.org/10.4081/mr.2011.e2>
21. **Goodman LA.** 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Ann. of Math. Stat. 35: 716 – 725.
22. **Favrin S.J, Jassim SA, Griffiths MW.** 2003. Application of a novel Immunomagnetic Separation–Bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. Int J Food Microbiol. 85: 63 – 71. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00483-X.
23. **Siqueira RS, Dodd CER, Rees CED.** 2003. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. Braz. J. Microbiol. 34: 118 – 120 doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500040>.
24. **Baxa U, Steinbacher S, Miller S, Weintraub A, Huber R, Seckler R.** 1996. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, *Salmonella* O-Antigen polysaccharide. Biophys J. 71: 2040 – 2048. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79402-X

25. **Castagna SMF, Muller M, Macagnan M, Rodenbusch CR, Canal CW, Cardoso M.** 2005. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Braz. J. Microbiol.* 36: 373 – 377 doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000400013>.
26. **Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R.** 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 290 – 296 doi: 10.1128/AEM.69.1.290–296.2003
27. **Flôres ML, Nascimento VP, Kader IITA, Cardoso M, Santos LR, Lopes RFF, Wald VB, Barbosa TMC.** Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. *Cienc. Rural* 33: 553 – 557. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000300025>.
28. **Dickel EL, Rodrigues LB, Santos LR, Valle SF, Pilotto F, Rodembush C, Wald VB, Canal CW, Nascimento VP.** 2005. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. *R. bras. Ci. Vet.* 12: 5 – 10 doi: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.327>.
29. **Soria MC, Soria MA, Bueno DJ, Colazo JL.** 2011. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for *Salmonella* detection in poultry feed. *Poultry Sci.* 90: 2606 – 2618 doi: 10.3382/ps.2011-01548.
30. **Stewart GSAB, Jassim SAA, Denyer SP, Newby P, Linley K, Dhir VK.** 1998. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.* 84: 777 – 783 doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00408.x.
31. **Saroj SD, Shashidhar R, Karani M, Bandekar JR.** 2008. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture – Nested PCR combination assay. *Mol. Cell. Probes* 22: 201 – 206 doi:10.1016/j.mcp.2008.02.002.
32. **Schönenbrücher V, Mallinson ET, Bülte M.** 2008. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 61 – 66 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.064.
33. **ISO6579:2002.** 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 27pp.
34. **DIN EN 12824:1998 – 02. 1998.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of salmonella (ISO 6579 : 1993, modified). Berlin: Din. 32p.

Instruções para os autores: <http://aem.asm.org/site/misc/ifora.xhtml>

4 CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico 2

“Trabalho a ser enviado para a revista Acta Scientiae Veterinariae”

Custos de dois Métodos Rápidos e o Exame Bacteriológico Convencional para a Detecção de *Salmonella enterica* em Carne de Frango.

ABSTRACT

Background: Um dos principais desafios para a cadeia avícola consiste no diagnóstico de *Salmonella* nos plantéis aviários e também em seus produtos, como carne e ovos, isto acarreta em perdas econômicas significativas para a maioria dos países, pois requerem investimentos em medidas de controle e prevenção. O objetivo principal deste estudo foi descrever os custos, as vantagens e desvantagens do uso de dois testes rápidos, Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e PCR, e do exame bacteriológico convencional para a detecção de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em amostras de carne de frango.

Materials, Methods & Results: Foram contaminadas artificialmente 270 amostras de lavado de sobrecoxas de frango, destas 90 amostras corresponderam ao sorovar Heidelberg, 90 ao sorovar Enteritidis e 90 ao sorovar Typhimurium. As sobrecoxas foram submetidas a três testes diagnósticos, o teste bacteriológico convencional, reação de PCR e Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. Os meios de cultura, reagentes e demais materiais necessários para realização dos testes foram descritos, bem como a metodologia empregada em cada ensaio. Após a realização dos testes, foram calculados os valores dos materiais utilizados, através de consulta de preços com os fornecedores, para determinação dos custos para a obtenção do resultado final. Os valores foram apresentados em reais, dólares e euros para facilitar a comparação com trabalhos de outros países. As amostras de *Salmonella* foram recuperadas pelos testes propostos, totalizando 258 amostras positivas no exame bacteriológico convencional, 269 amostras positivas no teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e

266 de positividade no PCR. Com relação aos custos de cada teste encontramos um valor médio por amostra de R\$5 (correspondendo a US\$1.43 ou €1.31) para o exame bacteriológico. No teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago o valor por amostra foi de R\$6,80 (US\$1.94 e €1.78). Já o valor das amostras pelo método de PCR foi de R\$4,60 (US\$1.31 ou €1.21). A etapa de pré-enriquecimento foi considerada comum a todos os testes, e seu custo aproximado foi de R\$9,10 (o valor convertido em dólares foi de US\$2.60 e em euros €2.39).

Discussion: As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma preocupação mundial e a questão principal visa o desenvolvimento de estratégias que permitam o seu controle garantindo a oferta de produtos seguros para o mercado consumidor. *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos associado a DTA, e a carne de frango e seus subprodutos são frequentemente relatados em surtos de salmonelose em humanos. O isolamento deste patógeno continua sendo um desafio para a cadeia produtiva que necessita de rapidez e ao mesmo tempo confiabilidade para a liberação de seus produtos. O exame bacteriológico convencional ainda é considerado *gold standard* para detecção de *Salmonella* em alimentos, as desvantagens deste método são o tempo necessário para a realização de todas as etapas, que dependendo da metodologia seguida pode chegar até a oito dias. Os testes rápidos avaliados apresentaram como vantagens a agilidade de diagnóstico e equivalência nos resultados com o teste padrão, sendo promissoras opções na rotina laboratorial para a triagem das amostras positivas. Mas existem poucos trabalhos descrevendo o custo/benefício das técnicas existentes para a detecção de patógenos alimentares. A avaliação dos custos para utilização de um novo ágar cromogênico no diagnóstico de *Salmonella* comparou os preços necessários para a sua implantação com os meios rotineiramente utilizados nos laboratórios. As etapas de inoculação, subculturas, triagem e confirmação foram estimadas, para 4.600 amostras, em €24.150, €42, €5.015, e €6.181, totalizando €35.388 utilizando meios de cultura tradicionais. Sendo que o custo unitário de cada amostra foi de €7,69, em reais o valor por amostra seria de R\$29,45. As diferenças encontradas, ao compararmos estes custos com os valores descritos em nosso trabalho, devem-se ao fato das marcas dos meios

de cultura serem diferentes, e também por não termos incluído em nossa pesquisa os custos de manutenção de equipamentos e das pessoas envolvidas no processamento das amostras.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium, separação imunomagnética, bacteriófago, PCR.

INTRODUÇÃO

Infecções por bactérias do gênero *Salmonella* são causadoras de doenças agudas e crônicas em aves, isto acarreta em perdas econômicas significativas para a maioria dos países, pois requerem investimentos em testes diagnósticos e medidas de controle e prevenção. Os plantéis de aves infectadas estão entre os principais reservatórios deste patógeno para o ser humano, através da transmissão pela cadeia alimentar por carne de frango e ovos contaminados. Este fato deve-se à alta prevalência de infecção por *Salmonella* nas aves domésticas, ao elevado número de frangos e perus criados comercialmente e também aos extensivos programas de identificação de produtos avícolas e plantéis infectados [6].

Um dos principais desafios para a cadeia avícola consiste no diagnóstico deste patógeno. O método bacteriológico convencional é recomendado pela maioria dos órgãos regulatórios, pois é considerado “*gold standard*” para análises de patógenos em alimentos, este aspecto é importante para o comércio internacional, mas a maior desvantagem é a exigência de grandes volumes de meios líquidos, sólidos e reagentes, além de que sua execução é laboriosa e, por consequência, ocorre inevitável demora na obtenção dos resultados, por isso métodos rápidos de diagnóstico estão sendo desenvolvidos para acelerar a detecção de patógenos em alimentos [14].

O objetivo deste estudo foi descrever os custos, as vantagens e desvantagens do uso de dois testes rápidos, Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e PCR, e do exame bacteriológico convencional para a detecção de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em amostras de carne de frango.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram contaminadas artificialmente 270 amostras de sobrecoxas de frango, adquiridas na rede de supermercados da cidade de Botucatu – SP, com três concentrações de inóculo, 100, 10 e 5 UFC/25mL, destas 90 amostras corresponderam ao sorovar Heidelberg, 90 ao sorovar Enteritidis e 90 ao sorovar Typhimurium. As sobrecoxas foram submetidas a três testes diagnósticos, o teste bacteriológico convencional, reação de PCR e Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago, segundo metodologias descritas abaixo, bem como os meios de cultura, reagentes e demais materiais necessários para realização dos testes.

Exame bacteriológico Convencional

Para o exame bacteriológico seguimos a metodologia recomendada pela legislação brasileira [3], para isto 25g de sobrecoxas de frango foram pesadas em balança analítica e transferidas para *stomacher bags* com filtro total, juntamente com 225mL de caldo *Tryptone Soya Broth* (TSB)¹, e homogeneizadas durante 2min em homogeneizador de amostras tipo *Stomacher*. Alíquotas de 25mL do lavado foram transferidas para tubos de 45mL e inoculadas com a concentração de interesse.

Posteriormente a inoculação, os 25mL foram adicionados em *stomacher bag* com 250mL de caldo TSB suplementado com 20µg/mL de novobiocina², para então dar-se início a etapa de pré-enriquecimento com a incubação em estufa bacteriológica durante 16h a 37°C. Em seguida foi realizado o enriquecimento seletivo, onde 0,1mL do caldo de pré-enriquecimento foi adicionado em 9mL de caldo Rappaport-Vassiliadis³, e outra alíquota de 1mL foi transferida para o 9mL do caldo Tetrationato³ acrescido de 0,2mL de solução de iodo e 0,1mL de verde brilhante, ambos foram incubados a 41°C por 24h. Então, os caldos foram estriados em placas de Petri com ágar sólido, os ágares de eleição foram o Ágar Verde Brilhante (AVB)⁴ e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD)⁴, que eram incubadas a 37°C durante 24h. A triagem

bioquímica foi realizada com as placas que apresentaram crescimento de colônias compatíveis morfológicamente com *Salmonella* spp.

Os meios utilizados para a triagem bioquímica foram Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)¹, Ágar Lisina Ferro (LIA)⁵, caldo Ureia⁵, meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM)¹ e Citrato de Simmons⁵. Também foi realizado o teste de soroaglutinação com antissoro polivalente “O” para *Salmonella*. As amostras que apresentaram colônias morfológicamente semelhantes à *Salmonella*, bioquímico de triagem equivalente e reação positiva no teste de soroaglutinação com antissoro polivalente eram consideradas positivas.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização do PCR utilizamos alíquotas de 1mL do caldo Rappaport-Vasidialis para extrair o DNA das amostras. A técnica de extração escolhida foi o tratamento térmico, para tanto foram realizadas três lavagens com 1mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) seguidas por centrifugação a $8.000 \times g$ durante 5min a 10°C e após a última lavagem o pellet era ressuspendido em 600µL de TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA, pH 8.0) e aquecido em banho-maria 95°C durante 10min. Por fim centrifugado a 8000rpm durante 5min a 10°C, sendo coletado 200µL do sobrenadante e armazenado a -20°C [4,2].

Utilizamos o primer para o gene *invA* (Fw: 5'-TTGTTACGGCTATTTTGACCA – 3' ; Rv: 5'- CTGACTGCTACCTTGCTGATG –3') [12] na concentração de 20picomol/µL. Para amplificação no volume final de 25µL, contendo 5µL de cada amostra, 1µL de cada primer, 12.5µL do *mix* de amplificação GoTaq[®] Green Master Mix⁷, e 5.5 µL de água ultrapura. A mistura foi processada em termociclador⁸, consistindo de: 5 min a 94°C, 35 ciclos de amplificação (30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C) seguido de extensão final por 4min a 72°C [8].

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com GelRed⁹ e a visualização realizada em transiluminador. Foram considerados positivos os produtos resultantes com tamanho esperado de 521pb.

Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago

Para este teste rápido utilizamos protocolo descrito por [5] com modificações, onde alíquotas de 1mL do caldo de pré-enriquecimento após o período de 16h de incubação. Estas eram acondicionadas em tubos tipo *Eppendorf* com adição de 20µL de Dynabeads®anti-*Salmonella*¹⁰ e submetidas à rotação de 30rpm por 30min em aparelho Dynal®MX4 mixer¹¹, após este período os tubos foram transferidos para o separador de partículas magnéticas Dynal Magnetic Particle Concentrator®MPC-S¹¹ durante 3min, para separar os *beads* do caldo de enriquecimento. Então o sobrenadante era aspirado e descartado e os *beads* eram lavados em solução tampão de PBS Tween-80 a 0,1% (PBST), e ressuspensos em 250µL de TSB. Esta primeira etapa é denominada captura.

Já na seguinte etapa, de ligação e amplificação, ocorre a incorporação de 0,1mL do bacteriófago P22 a amostra e subsequente incubação por 10min a 37°C em estufa bacteriológica. Então foi realizada outra etapa no separador de partículas magnéticas com novas lavagens com PBST e novamente as partículas foram ressuspensas em 0,1mL de TSB e incubadas durante 30min a 37°C.

Na última etapa, de incubação e detecção, adicionou-se em um novo microtubo o sobrenadante das amostras juntamente com 1mL de cultura pura de *Salmonella* Typhimurium, denominada (SAC), e foram incubados durante 2h a 37°C para que pudessemos detectar a expressão da lise pelo fago em amostras positivas. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro GeneQuant™*pro*¹².

Consideramos positivas as amostras que apresentaram uma densidade óptica 70% menor que a média dos valores obtidos nas amostras controle negativas. Estes valores foram estabelecidos em estudos realizados por [5]. Em resumo, as amostras positivas apresentaram decréscimo na densidade óptica, uma vez que o fago se ligou nos *beads* impregnados com *Salmonella* e expressou seu ciclo lítico ao ser exposto a uma nova cultura bacteriana (SAC). Já nas amostras negativas, detectamos uma elevada densidade óptica, pois não havia *Salmonella* ligada aos *beads*, então o bacteriófago não se ligou às partículas magnéticas e foi removido com as lavagens. Desta forma, ao

adicionarmos o SAC, no caso de amostras negativas, não existiam bacteriófagos capazes de combater as novas células de *Salmonella* presentes no SAC.

Determinação de Custos

Após a realização dos testes descritos, bem como o detalhamento dos reagentes e meios de cultura necessários para a realização de cada método, foram calculados os valores dos materiais utilizados em cada teste, através de consulta de preços com os fornecedores, e então foi determinado o custo por amostra para cada teste. Os valores serão apresentados em reais, dólares e euros para facilitar a comparação com trabalhos de outros países.

RESULTADOS

As amostras de *Salmonella* foram recuperadas pelos testes propostos, totalizando 258 amostras positivas no exame bacteriológico convencional, 269 amostras positivas no teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago e 266 de positividade no PCR.

Com relação aos custos de cada teste encontramos um valor médio por amostra de R\$5 (com valor correspondente em dólares de US\$1.43 e em euros €1.31) para o exame bacteriológico. No teste de Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago o valor por amostra foi de R\$6,80 (sendo US\$1.94 e €1.78). Já o valor das amostras pelo método de PCR foi de R\$4,60 (US\$1.31 e €1.21). A etapa de pré-enriquecimento foi considerada comum a todos os testes e incluía a utilização de sacos tipo *stomacher*, caldo TSB e o antibiótico novobiocina, e seu custo aproximado foi de R\$9,10, sendo o valor convertido em dólares de US\$2.60 ou em euros €2.39 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores aproximados do custo por amostra, em real, dólar e euro, para três métodos de diagnóstico para *Salmonella* em amostras de alimento.

Teste Diagnóstico	Real R\$	Dólar US\$	Euro €
Bacteriológico	14,10	4.03	3.70
PCR	13,70	3.91	3.60
Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago	15,90	4.54	4.17

DISCUSSÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma preocupação mundial devido seus crescentes números de casos, e a questão principal visa o desenvolvimento de estratégias para permitirem o seu controle, garantindo desta forma a oferta de produtos seguros para o mercado consumidor [11]. *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos associado a DTA, e a carne de frango e seus subprodutos são frequentemente relatados em surtos de salmonelose em humanos [9]. O isolamento desta bactéria continua sendo um desafio para a cadeia produtiva que necessita de rapidez e ao mesmo tempo confiabilidade para a liberação de seus produtos.

O exame bacteriológico convencional ainda é considerado “*gold standard*” para detecção de *Salmonella* em alimentos, as etapas que o constituem são um pré-enriquecimento não seletivo, seguido pelo enriquecimento seletivo, isolamento em ágar sólido, confirmação bioquímica e sorológica. As desvantagens deste método são o tempo necessário para a realização de todas as etapas, que dependendo da metodologia seguida pode chegar até em oito dias no caso do padrão europeu (DIN EN 12824:1998), e alguns autores relatam seu custo elevado [10, 7]. Em nosso trabalho também citamos como principal desvantagem o tempo de análise, seguindo a metodologia preconizada pela legislação brasileira demoramos quatro dias a confirmação do resultado, mas em relação aos custos observamos um padrão intermediário, ao compará-lo com os outros dois métodos, concordando com

outros autores que afirmam que o exame bacteriológico não exige uma infraestrutura cara e os materiais de consumo necessários são relativamente baratos [14].

Embora testes rápidos venham sendo desenvolvidos, as informações a respeito de seus custos reais e benefícios são escassos, um estudo descreveu que o custo de uma amostra pelo teste de PCR para *Campylobacter*, *Salmonella* e *E. coli* seria de £18,85, £15,66 ao utilizar imunoensaio e £15,01 com o método bacteriológico [1]. Convertendo estes valores teríamos R\$102, US\$12.08 e €13.46 no teste de PCR, para o imunoensaio o custo sairia R\$84,70, US\$10.03 e €11.1, já o exame bacteriológico padrão para estes patógenos seria de R\$81,24, US\$9.62 e €10.72 euros. Estes valores diferem dos encontrados em nosso trabalho, mas supomos que se deva ao fato da análise incluir três patógenos alimentares.

Outro trabalho avaliou os custos para utilização de Ágar Cromogênico no diagnóstico de *Salmonella* e comparou os preços necessários para a sua implantação com os meios rotineiramente utilizados nos laboratórios. As etapas de inoculação, subculturas, triagem e confirmação foram estimadas, para 4.600 amostras, em €24.150, €42, €5.015, e €6.181, totalizando €35.388 com o uso de meios de cultura tradicionais [13]. O custo unitário de cada amostra foi de €7,69, em reais o valor por amostra seria de R\$29,45. As diferenças encontradas, ao compararmos estes custos com os valores descritos em nosso trabalho, devem-se ao fato das marcas dos meios de cultura serem diferentes das empregadas por nós, e também por não termos incluído em nossa pesquisa os custos de manutenção de equipamentos e das pessoas envolvidas no processamento das amostras.

O ensaio de Separação Imunomagnética associado a Bacteriófago foi o teste para *Salmonella* com maior custo de execução, mesmo assim a diferença por amostra foi de R\$1,80 a mais que o teste bacteriológico padrão. O custo do anticorpo magnético anti-*Salmonella* o que elevou o valor da análise, pois os custos com reagentes neste teste foram irrisórios. As vantagens deste teste são a rapidez na obtenção dos resultados, pois são obtidos em 20h computando a etapa de pré-enriquecimento, e a detecção de amostras positivas apenas na presença de bactérias viáveis, uma vez que o bacteriófago

precisa de células bacterianas vivas para se ligar e expressar seu poder de lise.

Uma das vantagens constatadas na técnica de PCR foi o menor custo por amostra e resultados rápidos, em torno de 40h. Como desvantagens podemos citar a necessidade de um laboratório bem equipado e com equipe habituada com a técnica, por ser um teste que detecta o DNA bacteriano nem sempre apresenta a situação real da amostra.

CONCLUSÃO

Concluimos que os custos dos reagentes e meios de cultura por amostras, não incluindo os valores de manutenção do laboratório e funcionários, são semelhantes, sendo estes R\$13,70, R\$14,10 e R\$15,90, o mais barato o diagnóstico por PCR, seguido do bacteriológico convencional e então a Separação Imunomagnética associada a Bacteriófago. O exame bacteriológico é um método consagrado e recomendado pela legislação de diversos países, mas demanda tempo. Os testes rápidos avaliados apresentam como vantagens a agilidade de diagnóstico e equivalência nos resultados com o teste padrão, sendo promissoras opções na rotina laboratorial para a triagem das amostras positivas.

Manufacturers

¹ HiMedia, Mumbai, Índia.

² Inlab, Diadema, SP, Brasil.

³ Acumedia, Lansing, Michigan, Estados Unidos.

⁴ Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos.

⁵ Difco, Maryland, Estados Unidos.

⁶ PROBAC DO BRASIL, São Paulo, SP, Brasil.

⁷ PROMEGA, Madison, USA.

⁸ Eppendorf AG Mastercycler Gradient.

⁹ BIORAD

¹⁰ AppliedBiosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos.

¹¹ Invitrogen, Oslo, Norway.

¹² Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra, UK.

Funding. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP processo 2013/04365-3.

Acknowledgements. A CAPES pela concessão de bolsa de doutorado para Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa.

Ethical approval. This experiment was approved by CEUA/FMVZ-UNESP, protocol number 76/2012.

Declaration of interest. The authors declares no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Abubakar I., Irvine L., Aldus C.F., Wyatt G.M., Fordham R., Schelenz S., Shepstone L., Howe A., Peck M. & Hunter P.R. 2007.** A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technology Assessment* 36.
- 2 Andreatti Filho R.L., Gonçalves G.A.M., Okamoto A.S. & Lima E.T. 2011.** 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*. 12: 115 – 119.
- 3 Brasil. 2003.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA/ Secretaria da Defesa Agropecuária. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Instrução Normativa SDA nº. 62 de 26 de agosto de 2003. pp.1 – 76.
- 4 Fadl A.A., Nguyen A.V. & Khan M.I. 1995.** Analysis of *Salmonella* enteritidis isolates by arbitrarily primed PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 987 – 989.

- 5 Favrin S.J., Jassim S.A. & Griffiths M.W. 2001.** Development and optimization of a novel Immunomagnetic Separation-Bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 217 – 224.
- 6 Gast R.K. 2008.** *Salmonella* infections. In: Saif Y.M.; Fadly A.M.; Glisson J.R.; McDougald L.R.; Nolan L.K.; Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry*. 12.ed. Ames: Blackwell Publishing, pp.619 – 674.
- 7 Hagren V., von Lode P., Syrjälä A., Korpimäki T., Tuomola M., Kauko O. & Nurmi J. 2008.** An 8-hour system for *Salmonella* detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 158 – 161.
- 8 Marietto-Gonçalves G.A., Lima E.T., Donato T.C., Rocha T.S., Álvarez L.E.C, Sequeira J.L. & Andreatti Filho R.L. 2011.** Eradication of *Salmonella* Typhimurium in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. *Microbiological Research*. 3: e2.
- 9 Nadvorny A., Figueiredo D.M.S. & Schmidt V. 2004.** Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 47 – 51.
- 10 Schönenbrücher V., Mallinson E.T. & Bülte M. 2008.** A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *International Journal of Food Microbiology*. 123: 61 – 66.
- 11 Shinohara N.K.S., Barros V.B., Jimenez S.M.C., Machado E.C.L., Dutra R.A.F. & Lima Filho J.L. 2008.** *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*. 13: 1669 – 1674.
- 12 Swamy S.C., Barnhart H.M., Lee M.D., Dreesen D.W. 1996.** Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products,

wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3768 – 3771.

13 van Dijk S., Bruins M.J. & Ruijs G.J.H.M. 2009. Evaluation and implementation of a Chromogenic Agar Medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 456 – 458.

14 Zadernowska A. & Chajęcka W. 2012. Detection of *Salmonella* spp. presence in food. In: Mahmoud B.S.M. (Ed.) *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Rijeka: InTech, pp.393 – 412.

Instruções para os autores: <http://www.ufrgs.br/actavet/Instructions-ASV-English.pdf>

5 DISCUSSÃO GERAL

A escolha dos sorovares para os experimentos realizados nesta tese foi baseada em dados da literatura que relatam a incidência frequente destes em lotes de aves, produtos de origem avícola como carne e ovos e também a ocorrência de surtos de DTA em humanos com alguns destes sorovares envolvidos.

Pandini et al. (2014) avaliaram o perfil de resistência e os principais sorovares de *Salmonella* spp. isolados em aviários no estado do Paraná, para isto coletaram 342 suabes de arrasto, destes 39 foram positivos (11,4%) para *Salmonella* com 19 sorovares diferentes. O sorovar com maior isolamento foi *Salmonella* Heidelberg (12,82%), a frequência de *Salmonella* Mbandaka e *Salmonella* Newport foi de 10,25% e *S. Schwarzengrund*, *S. Enteritidis*, *S. Livingstone* e *S. Orion* corresponderam a 7,70%, a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi constatada em 51,3% das cepas que apresentaram resistência a um ou mais princípios. Andreatti Filho et al. (2009) também utilizaram suabes de arrasto em camas de aviário, totalizando 806 amostras, para verificar a ocorrência de *Salmonella* em granjas de frangos de corte no estado de São Paulo. Foram encontradas 22 amostras positivas para *Salmonella*, correspondendo a 2,7%, o sorovar com maior incidência foi o Give, com 50% dos isolados e *Salmonella* Enteritidis obteve 9,1% do total.

Outra pesquisa determinou a diversidade de genótipos e sorovares de 82 isolados de *Salmonella* spp. de granjas de frangos de corte utilizando o método bacteriológico convencional e a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e os sorovares mais frequentes foram Minnesota (40,24%), Infantis (14,63%), Heidelberg (7,31%), Senftenberg (6,09%) e Mbandaka (6,09%) (VOSS-RECH et al., 2015). Ahmed e Shimamoto (2014) analisaram produtos cárneos, entre eles carne de frango, e lácteos através de isolamento bacteriano e técnica de PCR no Egito o total de produtos submetidos às análises foi de 1600 amostras, e em 69 (4,3%) amostras houve a detecção de *Salmonella enterica*, os sorovares Typhimurium, Enteritidis e Infantis foram os mais prevalentes no total de isolamentos, mas ao avaliarmos apenas a detecção em produtos cárneos de origem aviária este quadro se inverte, pois o sorovar Infantis foi o mais detectado (com seis amostras positivas), seguido por

Salmonella Enteritidis (cinco amostras positivas) e então o sorovar Typhimurium (com a detecção de duas amostras).

Os sorovares de *Salmonella* detectados em plantéis avícolas e em pesquisas com alimentos possuem diferenças entre as regiões onde são executadas as coletas e também possuem variação temporal, pois dependendo do ano em que foi realizada a análise encontramos maior prevalência de determinado sorovar. Mesmo assim podemos constatar que, na maioria dos trabalhos, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são relatadas, embora a ocorrência seja variável.

Os alimentos de origem animal são associados, com frequência, na epidemiologia em casos de salmonelose em humanos, mesmo com os avanços tecnológicos, a carne de frango e seus subprodutos são passíveis de contaminação por micro-organismos do gênero *Salmonella* (CARVALHO; CORTEZ, 2005). O diagnóstico rápido e preciso deste patógeno alimentar atualmente é considerado um desafio, o método bacteriológico convencional é o mais utilizado para análise desta bactéria, mas requer mais de cinco dias para emissão de um resultado positivo. A possibilidade de variações bioquímicas e mutações genéticas que a bactéria *Salmonella* pode apresentar têm colocado em questionamento sua sensibilidade e especificidade, além disto, a demora na emissão de laudos pode comprometer as medidas de controle de frigoríficos ou a liberação de produtos cárneos para o mercado consumidor (DICKEL et al. 2005).

Mundialmente a maioria das legislações não permite a comercialização de carne de frango contaminada por *Salmonella*, e é essencial que os testes utilizados tenham alta sensibilidade, com capacidade de identificar quantidades mínimas deste patógeno nas amostras. A indústria necessita de resultados em curtos períodos de tempo para cumprirem a crescente demanda de produtos avícolas pelo mercado consumidor, por isso as pesquisas estão voltadas para suprir esta carência, para desenvolverem testes mais rápidos e aplicáveis à realidade encontrada.

Segundo Stone et al. (1994) os testes rápidos para identificação dos sorovares de *Salmonella* não substituirão as técnicas bacteriológicas convencionais para o diagnóstico deste patógeno, mas servirão como um complemento para o diagnóstico. Pois é necessário cultivar o micro-organismo

para a realização de antibiogramas, estudos epidemiológicos e sorotipagem. Ao combinarmos as técnicas haverá um incremento dos resultados positivos e consequente redução dos resultados falso-negativos.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Podemos concluir que a Separação Imunomagnética associada ao Bacteriófago P22 é um método promissor para o diagnóstico de *Salmonella* em carne de frango, pois foi capaz de detectar baixas concentrações de três sorovares, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, em um curto espaço de tempo sendo necessário apenas 20h para o resultado. Este teste, além de possuir extrema especificidade devido à associação com o bacteriófago, foi bastante sensível com 99,6% de amostras *Salmonella* detectáveis. A capacidade do bacteriófago de infectar somente células bacterianas viáveis é um ponto positivo para a seu emprego em testes de diagnóstico bacteriano.

A desvantagem constatada foi o custo, que comparado com os demais testes foi um pouco maior, este foi avaliado em R\$6,80 por amostra. Não constatamos diferença estatística em relação à detecção de *Salmonella* pelos três testes, confirmando a equivalência entre eles. Com o método bacteriológico conseguimos recuperar 95,5% de amostras positivas e com a técnica de PCR obtivemos 98,5% de positivos.

7 BIBLIOGRAFIA

AHMED, A.M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v.168–169, p. 57 – 62, 2014.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139 –1145, 2006.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo:Roca, 2007. p.96 –111.

ANDREATTI FILHO, R.L. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v.4, n.3, p.90 –101, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.190 – 194, 2009.

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**, v.31, n.2, p.303 –307, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria da Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA n.62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BENNETT et al. The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.259 – 265, 1997.

BROVKO, L.Y.; ANANY, H.; GRIFFITHS, M.W. Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.67, p.241 –288, 2012.

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

CENTERS for Disease Control and Prevention (CDC). **National *Salmonella* surveillance anual summary 2009**. 96p. 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/SalmonellaAnnualSummaryTables2009.pdf>>. Acesso em 20 jun. de 2015.

CENTERS for Disease Control and Prevention (CDC). **Foodborne Diseases Active Surveillance Network: FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report)**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 2014.

CHAMBERS, J. R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**, v.44, p.3149 – 3159, 2011.

CONCEIÇÃO, R.C.S. et al. Detection of *Salmonella* sp in chicken cuts using immunomagnetic separation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.173 – 177, 2008.

CRANE, D.D.; MARTIN, L.D.; HIRSH, D.C. Detection of *Salmonella* in feces by using Felix-01 bacteriophage and high-performance liquid chromatography. **Journal of Microbiological Methods**, v.2, p.251 –256, 1984.

CUDJOE, K.S. Detection by Immunomagnetic Particle-based Assay. In: ROBINSON, R.K; BATT, C.A; PATEL, P. (Eds). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, 1999. p.1968 –1976.

CUDJOE, K.S.; KRONA, R.; OLSEN, E. IMS: a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.159 –165, 1994.

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

EIJKELKAMP, J.M.; AARTS, H.J.M.; VAN DER FELS-KLERX, H.J. Suitability of Rapid Detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses. **Food Analytical Methods**, v.2, p.1 – 13, 2009.

FAVRIN, S.J.; JASSIM, S.A.; GRIFFITHS, M.W. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 217 – 224, 2001.

FAVRIN, S.J.; JASSIM, S.A.; GRIFFITHS, M.W. Application of a novel immunomagnetic separation–bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p. 63 – 71, 2003.

FLÔRES, M.L. et al. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da Reação em Cadeia pela Polimerase. **Ciência Rural**, v.31, p.315 – 318, 2001.

FLORES, F. **Parâmetros imunológicos frente à contaminação por *Salmonella* Enteritidis em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos e sua detecção por métodos fenotípicos e genotípicos.** 2011. 66p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

GALIKOWSKA, E. et al. Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.30, p.1067 – 1073, 2011.

GARCÍA, E.; LÓPEZ, R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v.15, p.306 – 312, 2002.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. (Org.) **Diseases of Poultry**. 12.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p.619 – 674.

GILL, J.; ABEDON, S.T. Bacteriophage Ecology and Plants. APSnet Feature Story, 2003. Online. DOI: 10.1094/APSnetFeature-2003-1103 Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BacteriophageEcology.aspx>>. Acesso em 19 jun. 2015.

HAGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 7p., 2007. DOI 10.1007/s00253-007-1031-8

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

KANNAN, P. et al. Bacteriophage-Based rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from ground beef. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.12, p.1551 – 1558, 2010.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: Biology and Applications**. Boca Raton: CRC Press. 2005. 528p.

LANTZ, P.G. et al. Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3416 – 3418, 1994.

LYNCH et al. Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.285 – 288, 2004.

MADIGAN, M.T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13.ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2011. 1043p.

MANSFIELD, L; FORSYTHE, S. Collaborative ring-trial of Dynabeads® anti-*Salmonella* for immunomagnetic separation of stressed *Salmonella* cells from herbs and spices. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p. 41 – 47, 1996.

MEDEIROS et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.30, n.6, p.555 – 560, 2011.

MOLE et al. Bacteriophage-based techniques for detection of food-borne pathogens. In: ROBINSON, R.K; BATT, C.A; PATEL, P. (Eds). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, 1999. p.1968 – 1976.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.47 – 51, 2004.

PANDINI, J.A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.XX, n.X, p.1 – 6, 2014.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. et al. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.57, p.288 – 294, 2013.

ROSSEN, L. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p.37 – 45, 1992.

SIMÕES, M. et al. *Salmonella* Enteritidis: importância do inquérito epidemiológico, análise de alimentos e coprocultura na elucidação de 167 surtos alimentares. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.4, p.497 – 502, 2010.

SIQUEIRA, R.S.; DODD, C.E.R; REES, C.E.D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.118 – 120, 2003.

STEWART, G.S.A.B et al. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.777–783, 1998.

STONE et al. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p. 1742 – 1749, 1994.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JR., J.G. Bacteriophage Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.3, p.649 – 659, 2001.

TIRADO, C.; SCHMIDT, K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: results and trends across greater. **Journal of Infection**, v.43, p.80 – 84, 2001.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n.3, p.433 – 441, 2015.

WELKER, C.A.D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, p.44 – 48, 2010.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA, W. Detection of *Salmonella* spp. presence in food. In: Mahmoud, B.S.M. (Ed.) **Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen**. Rijeka: InTech, 2012, p.393 – 412.