

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
Salmonella SPP. POR MEIO DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)
ASSOCIADO A TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR
LOOP (LAMP) EM CARÇAÇAS DE FRANGO.

AMANDA LOUISE LAURINDO

BOTUCATU – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
Salmonella SPP. POR MEIO DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)
ASSOCIADO A TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR
LOOP (LAMP) EM CARÇAÇAS DE FRANGO.

AMANDA LOUISE LAURINDO

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

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa
Araújo Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Sossai
Possebon.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Laurindo, Amanda Louise.

Desenvolvimento de sistema de detecção e quantificação de *Salmonella* spp. por meio de número mais provável (NMP) associado a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) em carcaças de frango / Amanda Louise Laurindo.
- Botucatu, 2022

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

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Fábio Sossai Possebon

Capes: 50505009

1. Frango de corte. 2. Carcaças. 3. *Salmonella*.
4. Técnicas microbiológicas. 5. Técnicas de amplificação de ácido nucleico.

Palavras-chave: Amplificação isotérmica; Controle microbiológico; NMP-LAMP.

Nome da Autora: Amanda Louise Laurindo

Título: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* SPP. POR MEIO DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) ASSOCIADO A TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) EM CARÇAÇAS DE FRANGO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/São Paulo

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Membro Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Membro Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)

Universidade de São Paulo (USP)

Data da defesa: 01/07/2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers INVA5 utilizados na qPCR para detecção de <i>Salmonella</i> ...	22
Tabela 2. Primers utilizados na LAMP para detecção de <i>Salmonella</i>	23
Tabela 3. Tabela para análise do Número Mais Provável (NMP).	25
Tabela 4. Valores de Cq na qPCR de isolados de <i>Salmonella</i> spp. com DNAs extraídos por diferentes métodos.....	26
Tabela 5. Comparação do NMP obtido através de diferentes técnicas.....	29
Tabela 6. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP convencional	30
Tabela 7. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP-LAMP utilizando o <i>kit</i> comercial (colorimétrico).	30
Tabela 8. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP-LAMP “ <i>in house</i> ”	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da microbiologia convencional para isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	15
Figura 2. Esquema da técnica de Número Mais Provável utilizada para detecção e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. neste estudo	16
Figura 3. Esquema da reação de LAMP	19
Figura 4. Esquema das etapas do NMP	24
Figura 5. Gráfico das curvas de amplificação para o alvo INVA5.	27
Figura 6. Resultado da reação de LAMP “ <i>in house</i> ”	27
Figura 7. Resultado da reação de LAMP utilizando o WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix	28

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1.	Panorama da avicultura brasileira.....	8
2.2.	Doenças de Origem Alimentar	10
2.3.	O gênero <i>Salmonella</i> spp.....	11
2.3.1.	Salmoneloses em aves	12
2.4.1.	Microbiologia Convencional	14
2.4.2.	Método do Número Mais Provável (NMP)	15
2.4.3.	Métodos moleculares: Extração de DNA para análises moleculares de <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.4.4.	Métodos moleculares: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR)	17
2.4.5.	Métodos moleculares: Amplificação Isotérmica Mediada por Alças – Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	18
2.4.6.	Custos dos insumos para diagnósticos.....	20
3.	Objetivo	20
3.1.	Objetivos específicos	20
4.	Materiais e Métodos	20
4.1.	Comparação entre os métodos de extração de DNA por fervura e por <i>beads</i> magnéticas	20
4.2.	Teste da reação de LAMP.	22
4.3.	Teste do Número Mais Provável (NMP) associado à LAMP ...	23
4.4.	Análise estatística.....	26
5.	Resultados	26
5.1.	Teste da extração com fervura	26
5.2.	Teste da reação de LAMP.....	27

5.3. Teste do Número Mais Provável (NMP) associado à LAMP

28

6. Discussão	31
7. Conclusão	33
Referências	34

RESUMO

O Brasil ocupa hoje posição de destaque no cenário avícola como o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo. No mercado interno, a carne de frango é preferência entre os brasileiros, seja por seu valor nutricional ou por seu preço mais acessível. Entretanto os números de casos de doenças de transmissão hídrica e alimentar – DTHA ainda são elevados. No Brasil, *Salmonella* spp. é um dos principais agentes envolvidos e a carne de frango e os ovos são os principais veículos. Atualmente os métodos de diagnóstico comumente utilizados para detecção e quantificação da *Salmonella* spp. são onerosos, demorados ou de alta complexidade de execução. Desta maneira, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um sistema rápido, prático e de baixo custo para detecção e quantificação de *Salmonella* spp em carne de frango, unindo as técnicas de Número Mais Provável e Amplificação Isotérmica Mediada por Alças (NMP-LAMP). Os objetivos específicos deste trabalho foram comparar dois métodos de extração de DNA (fervura e *beads* magnéticas), testar dois protocolos para reações de LAMP (“*in house*” e *kit* colorimétrico) e por fim, comparar o NMP convencional e NMP associado à técnica de LAMP, no qual alíquotas foram retiradas nas etapas de pré enriquecimento e enriquecimento seletivo, a fim de realizar extração e, em seguida, a técnica de LAMP. Os resultados das extrações de DNA obtiveram valores de Cq semelhantes. Já os protocolos de LAMP apresentaram resultados idênticos. Por fim o NMP-LAMP apresentou bons resultados quando comparado ao NMP convencional, já que não houve diferença estatística entre as técnicas, demonstrando que a união é promissora e sugerindo que é possível diminuir o tempo para obtenção de resultados. Entretanto os relatos acerca da união das técnicas ainda são escassos na literatura. Quanto aos custos, o maior valor da técnica de LAMP pode ser compensado pelo menor tempo na obtenção de resultados.

Palavras-chave: Amplificação isotérmica, NMP-LAMP, controle microbiológico

ABSTRACT

Brazil currently stands out in the poultry sector as the second largest producer and largest exporter of chicken meat in the world. In the domestic market, chicken meat is a nutritional preference among Brazilians, either for its value or for its more affordable price. Several cases of foodborne diseases are still higher. In Brazil, *Salmonella* spp. is one of the main agents involved and eggs and poultry meat are the main vehicle. Currently, the diagnostic methods commonly used for detection and quantification of *Salmonella* spp. are costly, time-consuming, or highly complex to implement. Thus, this work aimed to develop a fast, practical, and low-cost system for the detection and quantification of *Salmonella* spp in poultry meat, combining the Most Probable Number and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP-MPN) techniques. The specific objectives of this work were compared with two methods of DNA extraction (boil and magnetic beads), test two protocols for LAMP reactions (in house and colorimetric kit), and finally the comparison between conventional MPN and LAMP-MPN, in which aliquots were removed in the pre-enrichment and selective enrichment stages to perform DNA extraction, and then the LAMP technique. Both protocols of DNA extraction obtained similar Cq values. The LAMP protocols presented the same result. The LAMP-MPN showed good results when compared to conventional NMP, since there was no statistic difference between the techniques, demonstrating that the union is promissory and suggesting that it is possible to reduce the time to obtain results. However, reports of the union of techniques are still scarce in the literature. As for cost, the higher technical value of LAMP-MPN can be offset by the shorter time to maintain results.

Keywords: Isothermal Amplification, MPN-LAMP, microbiological control

1. INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 12 mil anos o ser humano deu um grande passo em seu processo evolutivo com a Revolução Agrícola, quando passou a cultivar plantas e domesticar animais (HARARI, 2014). Desde então, a intensificação da produção animal cresceu juntamente com a demanda por alimentos. Na avicultura, por exemplo, não foi diferente. O alto investimento tecnológico permitiu atingir números extraordinários de produção nos últimos anos. No de 2021, no mundo todo foram produzidas 99.901 mil toneladas de carne de frango (ABPA, 2022). Entretanto, o modelo de criação de aves em confinamento e a alta densidade facilitam a instalação e a disseminação de doenças, por muitas vezes zoonóticas, acarretando riscos à saúde do consumidor, como é o caso das doenças de origem alimentar, também conhecidas como doenças de transmissão hídrica e alimentar – DTHA (ZANINELLI et al., 2019; MENDONÇA et al., 2011; COLLINS et al., 2004).

As doenças de origem alimentar são aquelas que resultam da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, parasitos, toxinas ou outros agentes tóxicos, como por exemplo, pesticidas (LIU, 2018). Além dos riscos à saúde, principalmente dos grupos mais vulneráveis (crianças, idosos e imunossuprimidos), estas doenças também trazem prejuízos aos sistemas de saúde de diversos países. A Organização Mundial de Saúde – OMS estima que todos os anos, 1 a cada 10 pessoas adoecem devido ao consumo de alimentos contaminados, gerando aproximadamente 600 milhões doentes e 420 mil mortes no mundo todo (PIRES et al., 2021; WHO et al., 2015). Levando-se em consideração o cenário pandêmico vivido nos últimos anos, pessoas com outros problemas de saúde ou doenças, encontraram dificuldades na busca por atendimento hospitalar, seja pelo medo de contaminação ou pela altas taxas de ocupação de leitos (FARIA, 2021).

Dentre os agentes patogênicos associados às DTHA, *Salmonella* spp. é protagonista de grande parte dos surtos. Acredita-se que mundialmente ela seja responsável por mais de 78 milhões de casos e cerca de 28 mil mortes todos os anos (MURREY et al., 2021; KIRK et al., 2015). A transmissão se dá principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados por fezes de

animais e pelo contato com animais domésticos e com o ambiente em que eles vivem (MURREY et al., 2021; HOELZER et al., 2011; BRYAN, 1978).

Dada a importância para a saúde pública, governos e indústria buscam criar programas para reduzir e até mesmo eliminar o patógeno dos alimentos. No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA (BRASIL, 2020) traz instruções normativas que abrangem diversos pontos da cadeia produtiva de aves. Já Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os padrões microbiológicos para alimentos na forma em que serão ofertados para os consumidores. Enquanto nas indústrias há os programas de autocontrole tais como as boas práticas de fabricação – BPF e a análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC servem como ferramentas para garantir a produção de alimentos seguros.

Ainda hoje se faz necessário o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais rápidas e com menor custo para o monitoramento dos patógenos nos diversos pontos da cadeia produtiva, visto que os métodos convencionais demandam tempo e muitos insumos para a sua realização (DE ANDRADE et al., 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama da avicultura brasileira

A avicultura brasileira se destaca no cenário mundial, sendo que em 2021, mesmo com todas as adversidades causadas pela pandemia, foram produzidas 14.329 mil toneladas de carne de frango, onde 4.610 mil foram destinadas à exportação, o que colocou o país como terceiro maior produtor e primeiro maior exportador deste produto (ABPA, 2022).

A produção de frangos de corte é distribuída por todo o território nacional, com destaque para a região sul, responsável por cerca de 64% da produção, seguida pela região sudeste, com aproximadamente 17% (ABPA, 2022). Cerca de 68% da produção nacional é destinada ao mercado interno (ABPA, 2022), sendo que a carne de frango é a mais consumida pelos brasileiros. Em 2021 foram 45,56 kg por habitante, a frente das carnes bovina com 26 Kg e suína com 16,7 kg (ABPA, 2022; CONAB, 2021). Diversos fatores podem explicar esta preferência, tais como seu baixo preço, quando comparada aos outros tipos de

carnes, valor nutricional, facilidade de preparo e versatilidade de cortes e de produtos semipreparados e prontos para consumo (CARDOSO, 2015).

Para atingir melhores níveis de produtividade e pela característica de produção em confinamento, os plantéis, em sua grande maioria, possuem alta densidade de aves, facilitando a instalação e disseminação de doenças. Dentre elas destaca-se *Salmonella* spp., que acarreta prejuízos econômicos como perda de peso e mortalidade das aves e, também traz riscos para a saúde pública, como por exemplo no caso das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) (ZANINELLI et al., 2019; MENDONÇA, 2011).

No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA apresenta medidas para prevenção, controle e erradicação de doenças de importância na avicultura e na saúde pública, seguindo o preconizado pelo Código Sanitário para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (BRASIL, 2020). No PNSA são estabelecidas medidas de controle e monitoramento dos sorotipos de *Salmonella* Pullorum, Gallinarum, Enteritidis e Typhimurium nas granjas e nos demais estabelecimentos processadores de produtos avícolas. Para tanto, estão disponíveis três instruções normativas:

- **Instrução Normativa SDA nº 78, de 3 de novembro de 2003**, que aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2003);

- **Instrução Normativa MAPA nº 56, de 04 de dezembro de 2007**, que estabelece os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino ou pesquisa (BRASIL, 2007); e

- **Instrução Normativa SDA nº 20, de 21 de outubro de 2016**, que estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor (BRASIL, 2016).

A ANVISA, por meio da Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019, estabelece padrões microbiológicos para diversos alimentos prontos para oferta ao consumidor, dentre eles a carne de aves, sendo o padrão em 25 gramas, ausência de *Salmonella* spp (BRASIL, 2019).

Mesmo com todo o investimento em sanidade, *Salmonella* spp. ainda hoje se faz presente na avicultura. Segundo YAMATOGLI et al. (2016), em seu estudo a prevalência de *Salmonella* em produtos de frango destinados ao consumo variou de 39,3 a 86,7%. Outros autores demonstram a presença desta bactéria nos mais diversos pontos das cadeias produtivas de aves. Por exemplo, WALDMAN et al. (2020) identificaram por meio de análises moleculares a presença em amostras de pool de órgãos, vísceras, suabes de arrasto e botas, fezes e ração provenientes de granjas de frangos de corte. Ainda, SILVEIRA et al. (2019) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em cortes de filé de frango destinado à alimentação escolar.

2.2. Doenças de Origem Alimentar

Doenças de origem alimentar são aquelas causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados com bactérias, vírus, fungos, príons, parasitos, toxinas e substâncias tóxicas, tais como agrotóxicos (BRASIL, 2019). Os produtos de origem avícola estão expostos a uma vasta gama de agentes contaminante nas mais diversas etapas da produção de aves. Desta forma, os programas sanitários de monitoramento e controle nos incubatórios e granjas e os programas de higiene e autocontrole de abatedouros e entrepostos são uma ferramenta para garantir a saúde do consumidor.

Bactérias do gênero *Salmonella* são hoje um dos principais agentes envolvidos nas DTHA e estão frequentemente associados ao consumo de carne de aves, ovos, produtos cárneos e produtos frescos tais como frutas, verduras e legumes (MORGADO et al., 2021; BARANCELLI et al., 2012). Entretanto cabe destacar que diversos tipos de produtos de origem animal, tais como leite, carne bovina e suína e até mesmo a água são importantes veículos de transmissão do patógeno ao ser humano (MEGID et al, 2016).

Nos Estados Unidos estima-se que anualmente ocorram aproximadamente 1,2 milhões de casos de salmonelose não tifoide, com 450 mortes (CDC, 2019). Já no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, entre

os anos de 2012 e 2021 foram registrados 6.347 surtos de DTHA, com 610.684 expostos, 104.839 doentes, 13.446 hospitalizados e 9 óbitos, sendo a *Salmonella* spp. o terceiro agente mais identificado em 11,2% dos casos, atrás apenas da *Escherichia coli* em 29,6% e do *Staphylococcus aureus* em 12,9% (BRASIL, 2022). Os sinais e sintomas de uma infecção por *Salmonella* não tifoidal são muito semelhantes aos de outras gastroenterites. Além disso, muitas vezes as doenças evoluem para a cura sem a necessidade de hospitalização e identificação do agente, o que leva a crer que o número de casos seja subestimado (SHINOHARA et al., 2008).

Salmonelas são habitantes do trato gastrointestinal dos animais e apesar de todo o investimento tecnológico e da adoção de programas de autocontrole no abate de aves, ainda não há uma ferramenta eficaz que garanta a eliminação da bactéria nas carcaças de frangos. No abate de frangos de corte há pontos críticos onde a chance de contaminação são maiores, como na escaldagem, depenagem, evisceração e principalmente as etapas de resfriamento (CORRÊA, 2021; VON RÜCKERT et al., 2009). Sendo assim, o monitoramento por meio da identificação e quantificação deste agente nos alimentos é importante para a dimensionar a carga microbiana na superfície das carcaças e verificar a eficiência das ações nos pontos de controle destas etapas, a fim de garantir a segurança do consumidor (SANTOS, 2014; RISTORI et al., 2008), uma vez que o ambiente residencial é o principal local de ocorrência de surtos por DTHA (BRASIL, 2022). BLANC e AZEREDO (2014) observaram em sua pesquisa comportamentos inadequados dos consumidores quanto à manipulação e conservação de alimentos, que podem levar à contaminação cruzada no ambiente residencial e a riscos aos grupos mais vulneráveis.

2.3. O gênero *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Morfologicamente são caracterizadas por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríquios, à exceção dos sorotipos Gallinarum e Pullorum, que são imóveis; podendo ou não ser capsulados e não formadoras de esporos. São fermentadoras de glicose (com produção de ácido e gás), além de arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol; entretanto não fermentam lactose, sacarose, malonato e salicina. São

consideradas oxidase negativa e catalase positivas. Nas provas de indol, Voges Proskauer, vermelho de metila e ureia, são negativas. Ainda, realizam descarboxilação de lisina e ornitina, reduzem nitrato a nitrito e utilizam citrato como fonte única de carbono. Sua temperatura de crescimento está na faixa de 5 a 46°C, sendo 38°C a temperatura ótima. Por não formarem esporos, estas bactérias são termosensíveis, ou seja, são destruídas a temperaturas superiores a 60°C, entre 15 e 20 minutos (BRASIL, 2011; GAST et al., 2020).

Atualmente estão divididas em duas espécies geneticamente distintas: *S. bongori*, e *S. enterica*, sendo esta, dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Existem mais de 2600 sorovares, que são classificados segundo o esquema de Kaufmann & White, com base em seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Desta maneira, a nomenclatura se dá pelo gênero *Salmonella* e o sorotipo, por exemplo, Enteritidis. (MCVEY et al., 2016; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015; FORSYTHE, 2013).

A *Salmonella* spp. possui distribuição cosmopolita e o principal reservatório é o sistema gastrointestinal de animais de sangue quente e frio. Os principais veículos são o solo, água, vegetais e alimentos de origem animal contaminados com a bactéria. A principal forma de transmissão é pela via fecal-oral, quando há ingestão de água ou alimentos contaminados. A ocorrência da doença depende de diversos fatores tais como a dose infectante, o status imune do hospedeiro e o sorotipo envolvido (MCVEY et al., 2016).

2.3.1. Salmoneloses em aves

A principal via de entrada da *Salmonella* no organismo é a oral, por meio de alimentos ou água contaminados. Após atravessar a barreira ácida do estômago, a bactéria migra para o intestino, preferencialmente para as regiões do ceco e das junções ileocecais, onde realiza a adesão ao epitélio por meio de suas fímbrias. O processo de invasão pode ocorrer em enterócitos e células caliciformes. Entretanto, as salmonelas demonstram certa preferência pelas células M das microvilosidades intestinais. Cabe salientar que este tipo celular recobre estruturas linfoides, como por exemplo as placas de Peyer, além de serem especializadas na apresentação de antígenos. Uma vez dentro da célula M, ela alcança submucosa, onde encontra os fagócitos. A invasão também pode

ocorrer em células dendríticas ou por meio de rompimento de *tight junctions*. Após atravessar o epitélio, são fagocitadas por macrófagos, e por meio de mecanismos moleculares bacterianos, são capazes de sobreviver dentro dos macrófagos, causando a morte celular e o recrutamento de mais macrófagos, o que facilita a disseminação para outros órgãos, como o fígado e o baço (SANTOS e ALESSI, 2016; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

O processo de invasão de *Salmonella* produz mudanças morfológicas nos enterócitos e o desequilíbrio eletrolítico, que leva à morte celular. A perda da camada mucosa associada a transmigração de células de defesa leva ao processo de diarreia, resultando em contaminação do ambiente e disseminação da doença (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015; SANTOS e ALESSI, 2016; GAST et al., 2020).

Nas aves esta bactéria pode causar três doenças distintas. As hospedeiro-específicas, representadas pelos sorovares imóveis Gallinarum e Pullorum, causam respectivamente o tifo aviário e a pulorose. Já os agentes do paratifo aviário englobam os outros sorotipos que não os supracitados, móveis, como por exemplo a *S. Enteritidis* e a *S. Typhimurium*. Os agentes do paratifo eventualmente podem causar doenças nas aves, mas comumente estão relacionados a surtos de DTHA (BERCHIERI et al., 2009; GAST et al., 2020).

A pulorose tem como agente patogênico a *Salmonella* Pullorum e afeta comumente as aves mais jovens, com sinais clínicos mais evidentes nas três primeiras semanas de vida, geralmente com alta mortalidade nos plantéis. Aves que sobrevivem a infecção acabam tornando-se portadoras, disseminando a doença, principalmente por via transovariana. Os pintinhos infectados podem apresentar sonolência, asas caídas, penas arrepiadas, amontoamento, fraqueza, perda de apetite, retardo no crescimento, fezes esbranquiçadas e dificuldade respiratória seguida da morte do animal. O curso da doença em aves adultas é breve, e geralmente são manifestados sinais clínicos inespecíficos ou pouco evidentes (BERCHIERI et al., 2009; GAST et al., 2020).

O tifo aviário possui como agente etiológico a *Salmonella* Gallinarum e é mais presente em aves adultas, mas também pode acometer aves jovens e confundir-se com a pulorose. As matrizes comerciais são mais comumente afetadas, embora a doença também ocorra em matrizes de corte. A transmissão ocorre principalmente de maneira horizontal, por contato direto de aves saudáveis e

doentes, presença de aves mortas, canibalismo e ausência de controle das condições de higiene da granja. Há relatos de transmissão vertical, entretanto estas são menos frequentes. Os principais sinais clínicos são prostração, fraqueza, diarreia amarelo-esverdeada, queda de postura, perda de peso e dispneia seguida de morte (BERCHIERI et al., 2009; ZANINELLI et al., 2019).

O paratifo aviário pode ser causado por vários sorotipos de *Salmonella* (exceto Gallinarum e Pullorum), sendo os mais comuns *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. A transmissão se dá de maneira vertical, pela contaminação do ovo no trato reprodutivo e ao passar pela cloaca; e horizontal, no contato entre aves sadias e infectadas, por inalação, pela conjuntiva ocular e pela ingestão de água ou alimentos contaminados. As aves mais jovens são mais acometidas e apresentam apatia, penas arrepiadas, perda de peso e diarreia. Nas aves adultas os sinais clínicos são mais brandos e podem surgir após situações de muito estresse. A importância desse grupo de salmonelas está na saúde pública, uma vez que podem persistir nos alimentos de origem animal, neste caso ovos e carnes, ocasionando surtos de DTHA (BERCHIERI et al., 2009; ZANINELLI et al., 2019).

2.4. Diagnóstico

2.4.1. Microbiologia Convencional

O isolamento de *Salmonella* spp. segue procedimentos padrão, como por exemplo o ISO 6579 (FORSYTHE, 2013). Segundo a Instrução Normativa nº20, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a análise deve ser feita em 25 gramas de amostra contendo pele e músculo, das regiões pericloacal, asa e pescoço (BRASIL, 2016). O método convencional de cultivo de *Salmonella* spp. de amostras de alimento consiste em 5 etapas, sendo elas pré-enriquecimento em caldo não seletivo, enriquecimento seletivo, semeadura em ágar seletivo, confirmação bioquímica e confirmação sorológica por soroaglutinação rápida em placa (BRASIL, 2004; FORSYTHE, 2013).

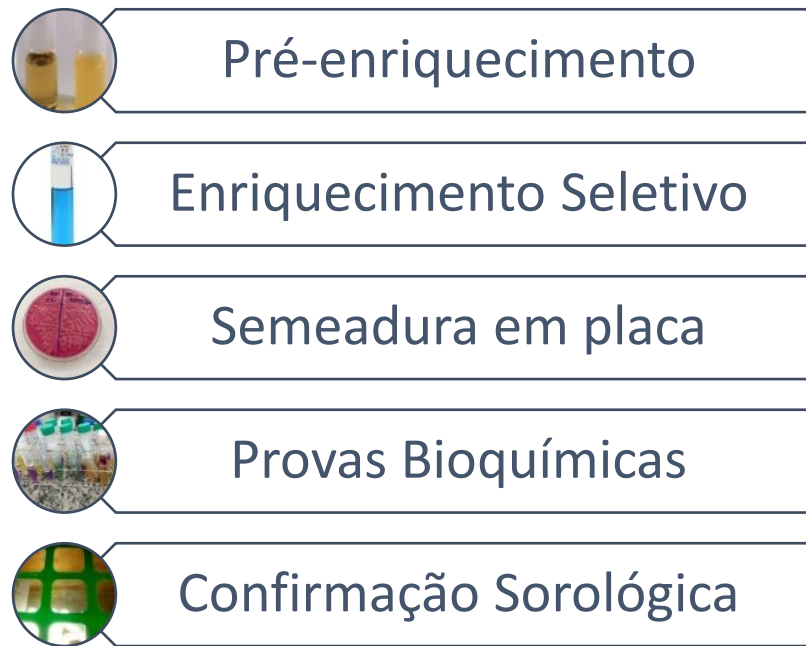


Figura 1. Esquema da microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. Fonte: Autora.

2.4.2. Método do Número Mais Provável (NMP)

Também chamada de técnica dos múltiplos tubos, o número mais provável permite estimar a concentração de bactérias viáveis presentes em uma determinada amostra de alimento ou água. Para *Salmonella* spp. são coletadas amostras de pele, que são acrescidas de caldo de enriquecimento e então são distribuídas em três tubos para a realização das diluições em série, resultando em nove tubos. Em seguida são transferidas alíquotas para meios de enriquecimento seletivo. Posteriormente, ocorre a semeadura das amostras em ágar específico, seguida da confirmação bioquímica e da confirmação sorológica por soroaglutinação rápida em placa, conforme demonstrado no esquema abaixo. Comparando os resultados com os da tabela padrão, é possível obter o número mais provável de *Salmonella* spp. na amostra (FORSYTHE, 2011; ANVISA, 2004; DUFRENNE, 2001).

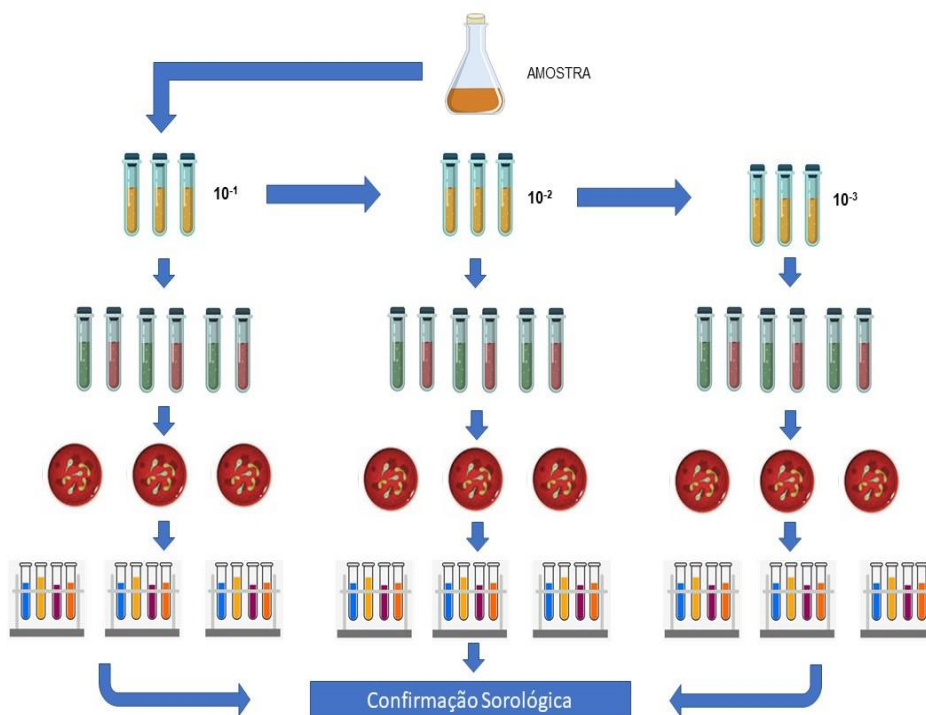


Figura 2. Esquema da técnica de Número Mais Provável utilizada para detecção e quantificação de *Salmonella* spp. neste estudo. Fonte: Autora.

2.4.3. Métodos moleculares: Extração de DNA para análises moleculares de *Salmonella* spp.

Com o avanço das técnicas de diagnóstico molecular observa-se que a quantidade e qualidade dos reagentes disponíveis têm permitido que sejam alcançados resultados mais acurados na identificação do DNA de *Samonella*. A extração é uma etapa primordial para obter alta eficiência na amplificação (OLIVEIRA et al., 2007, OBERACKER et al., 2019). Os protocolos para obtenção do DNA variam de acordo com o tipo de amostra e podem ser adaptados e otimizados conforme com a necessidade e a disponibilidade de recursos. O processo de extração passa por algumas etapas essenciais que são a lise celular para liberação do material genético; os processos de lavagem, para separação do DNA de restos celulares e proteínas; e a eluição ou purificação, etapa na qual há a separação ou liberação do material genético a ser utilizado no diagnóstico (COSTA e MOURA, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

A técnica de extração por fervura é um método amplamente utilizado em estudos (LÖFSTRÖM et al., 2012; BUNDIDAMORN et al., 2018; AHADUZZAMAN et al., 2021), de baixo custo e fácil execução, uma vez que necessita de apenas um reagente (água nuclease *free*) e poucos equipamentos

(banho-maria e centrifuga). Entretanto possui como desvantagem a dificuldade na automatização, devido às diversas etapas de centrifugação e fervura.

Recentemente, o processo de extração com *beads* magnéticas surgiu como alternativa aos *kits* de extração com colunas e aos reagentes tóxicos, como por exemplo o fenol. As *beads* são nano ou micropartículas que possuem a habilidade de se ligar de maneira reversível aos ácidos nucleicos e que na presença de um ímã forte podem ser carregados ao longo das etapas da extração. Os protocolos com *beads* possuem a vantagem de serem facilmente automatizáveis, além de necessitarem de materiais mais baratos, quando comparados aos *kits* comerciais (OBERACKER et al., 2019).

2.4.4. Métodos moleculares: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR)

Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, técnica de PCR convencional permite a detecção e amplificação das sequências de interesse de uma amostra contendo DNA ou RNA. Após a extração do material genético, a amostra é adicionada a um *mix* contendo os *primers*, a enzima termoestável Taq polimerase, cloreto de magnésio, que funciona como co-fator para a enzima, os desoxinucleotídeos (dNTPs) e água nuclease *free* para o ajuste do volume final. Este conjunto é então levado para um termociclador. A reação acontece em 3 etapas. A primeira é a desnaturação, que ocorre em uma temperatura de 94-95°C por 10 a 15 minutos, pela qual há a abertura da fita pela quebra das pontes de hidrogênio. Em seguida, a temperatura baixa para 60°C e ocorre a hibridização, quando os *primers* se ligam a sequência. Esta etapa dura de 30 segundos a um minuto. Por fim, a temperatura se eleva a 72°C e a extensão acontece. Nesta etapa, a Taq começa a adicionar os nucleotídeos, formando novamente uma dupla fita. Este ciclo se repete por 30 a 40 vezes, dependendo do tipo de amostra, produzindo cerca de 10⁹ cópias. Ao fim, é possível realizar uma análise em gel de eletroforese para que os resultados sejam observados. Já a qPCR é uma técnica muito semelhante a PCR convencional. A diferença entre elas é que na qPCR há a adição de substâncias fluorescentes, como SYBR® Green ou sondas TaqMan® para permitir a leitura do tubo em cada ciclo da reação. Além disso, esta técnica é quantitativa e é possível observar os

resultados em tempo real, em um programa de computador (NELSON e COX, 2011; BARROS, 2008).

Diversos estudos mostram a aplicabilidade destas técnicas na detecção e quantificação do DNA em amostras de alimentos. Contudo, estes métodos podem estar sujeitos a falsos positivos, no caso da presença de bactérias inativadas (RICHTER et al., 2018; HUANG et al., 2021).

2.4.5. Métodos moleculares: Amplificação Isotérmica Mediada por Alças – Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Desenvolvida por Notomi et al. (2000), a técnica de LAMP pode ser considerada inovadora, pois se trata de uma reação isotérmica, de curta duração e alta especificidade. Esta técnica utiliza uma polimerase com alta atividade de deslocamento de fita juntamente com dois *primers* internos (FIP e BIP), dois *primers* externos (B3 e F3) e dois *primers* formadores do *loop* (LF e LB). Estes *primers* reconhecem seis a oito regiões específicas da sequência de interesse, tornando o teste altamente específico. A reação ocorre basicamente em duas etapas uma denominada não-cíclica, na qual há a formação dos *loops*, e a cíclica, em que estes fragmentos “*loops*” serão amplificados exponencialmente (GONÇALVES, 2014). O tempo de reação também é curto e em cerca 30 minutos a uma hora é possível obter 10^9 cópias (NUNES, 2013) do alvo. Outra vantagem desta técnica é que os resultados podem ser observados a olho nu, pela simples adição de SYBR® Green ou até mesmo um indicador de pH, como o vermelho fenol. Nas amostras positivas há mudança de cor. No caso do SYBR® Green, as amostras positivas apresentarão uma cor esverdeada, com emissão de fluorescência quando expostas a luz ultravioleta. Já o vermelho fenol apresentará mudança da cor vermelha para amarela, pela acidificação do meio devido a produção de pirofosfato (NOTOMI et al., 2000; TANNER et al., 2015).

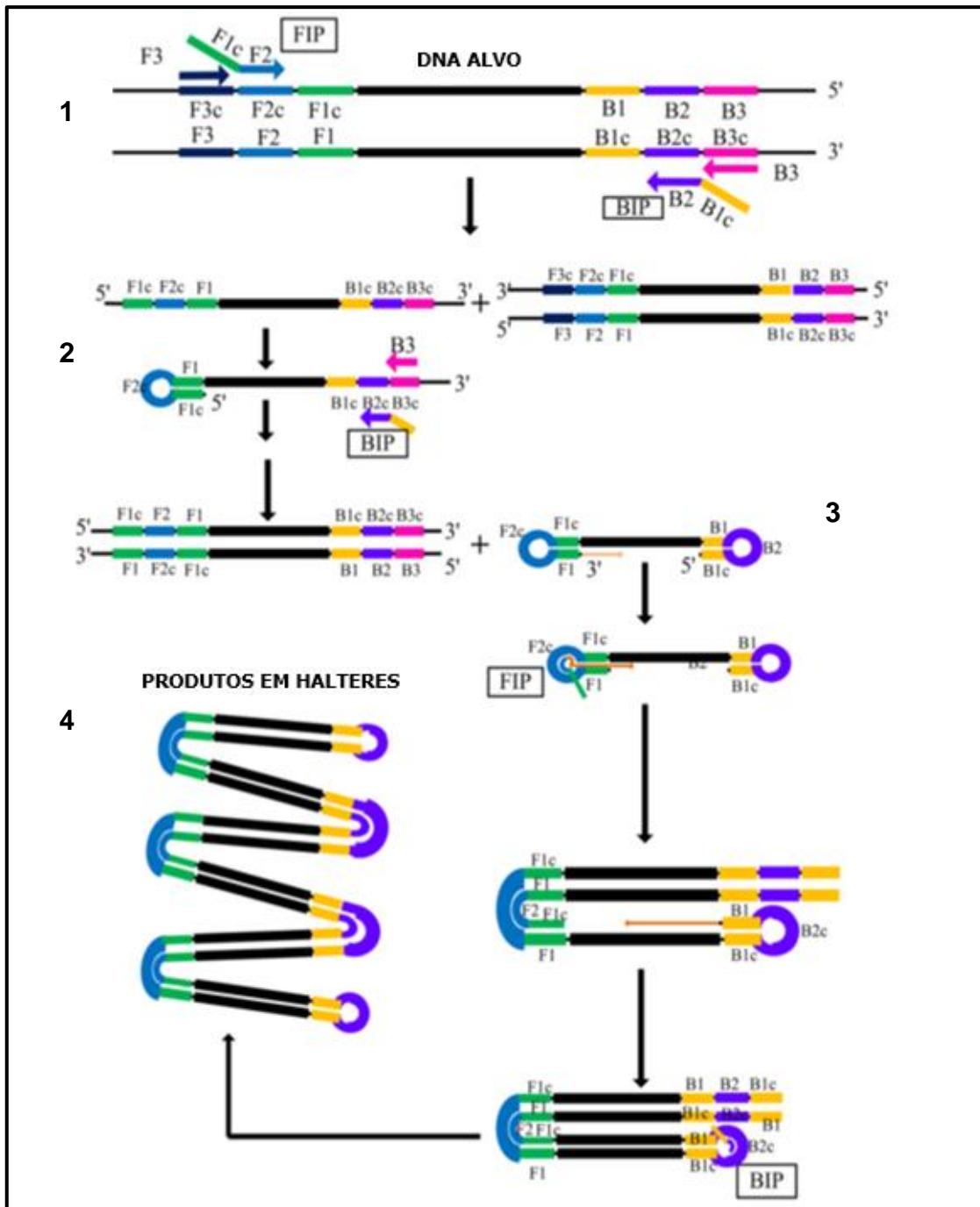


Figura 3. Esquema da reação de LAMP. 1. A reação se inicia quando a porção F2 do primer interno FIP se liga à região F2c do DNA alvo e começa a síntese da fita complementar. Em seguida, o primer externo F3 se liga a região F3c do DNA, deslocando a fita complementar formada anteriormente. 2. Devido a complementariedade das regiões F1 e F1c na extremidade 5' a fita se dobra, formando uma estrutura em "laço" (loop). A fita contendo esta estrutura serve de molde para o primer interno BIP. A porção B2 então se liga a região B2c do alvo e inicia-se a síntese da fita complementar. O primer externo B3 então se liga a região B3c e faz com que a fita se solte. 3. Pela complementariedade nas duas extremidades, há a formação de uma estrutura em "haltere". A enzima Bst DNA polimerase adiciona os nucleotídeos na extremidade 3' da porção F1, que estende a fita e abre o loop na porção 5'. Esta nova estrutura serve para iniciar a fase exponencial da LAMP. Os primers Loop (F e B) podem ser adicionados para acelerar a fase exponencial. 4. Os produtos obtidos são uma mistura entre halteres e laços (loops), com diversos comprimentos. Adaptado de XU et al., 2019.

2.4.6. Custos dos insumos para diagnósticos

Além da rapidez no diagnóstico a busca por redução de custos também é árdua. Ainda mais no contexto da pandemia, no qual os insumos foram em sua grande maioria, destinados ao combate da COVID-19, se tornando assim escassos e mais caros.

Análises microbiológicas baseadas em cultivos, como o NMP, além de muito laboriosas, demandam muito tempo (dias ou até mesmo semanas) e apresentam alto custo, uma vez que utilizam muitos insumos na sua realização. As técnicas moleculares tais como a PCR e LAMP surgiram como alternativa para detecção de patógenos em alimentos, pela rapidez em se obter resultados e por usar menos insumos, além da sua alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, estas técnicas ainda possuem algumas limitações, como a dificuldade em diferenciar células viáveis de não viáveis e a presença de inibidores nos alimentos, dificultando a análise (BOUKHAROUBA et al., 2022; XU et al., 2019; ZENG et al., 2016).

3. Objetivo

O objetivo principal do presente trabalho foi padronizar um teste rápido e de baixo custo para detectar e quantificar *Salmonella* spp. em carcaças de frango, por meio da união da técnica de Número Mais Provável e LAMP (NMP-LAMP).

3.1. Objetivos específicos

- Comparar os métodos de extração de DNA por fervura e por *beads* magnéticas.
- Testar da reação de LAMP.
- Testar do Número Mais Provável associado à LAMP.
- Estimar o custo entre NMP convencional e NMP-LAMP.

4. Materiais e Métodos

4.1. Comparação entre os métodos de extração de DNA por fervura e por *beads* magnéticas

Quatro isolados de *Salmonella* previamente identificados foram ressuspendidos em caldo LB (Invitrogen, EUA) e submetidos a dois métodos de

extração de DNA. O método de extração por fervura foi o descrito por AHADUZZAMAN et al. (2021). Paralelamente, as amostras foram extraídas com um protocolo *in house*, utilizando *beads* magnéticas, adaptado de POSSEBON et al., 2022.

Para a extração com fervura 1 ml de cada amostra foi transferido para um tubo de 1.5 ml. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado com cuidado e foram adicionados 300 µl de água nuclease free para ressuspender o *pellet*. Logo após os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 13.000 x g. Novamente o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de água nuclease free. As amostras foram então incubadas a 100°C por 15 minutos e imediatamente colocadas em gelo por mais 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, incubado a 100°C por 10 minutos e resfriado por mais 10 minutos.

A extração com *beads* foi realizada com 1 ml de amostra, que foi centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 740 µl de solução de lise contendo 350 µl de tampão de lise (isotiocianato de guanidina - GITC a 5,5 M, TRIS-Cl pH 8 a 50 mM, EDTA pH 8 a 20 mM, N-Lauroylsarcosine a 2% e antiespumante a 0,1%), 350 µl de isopropanol e 40 µl de *beads*. Após a homogeneização, os tubos foram incubados por 5 minutos em rack magnética. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não perturbar as *beads*. Em seguida foram adicionados 500 µl da primeira solução de lavagem, que continha 250 µl de GITC e 250 µl de isopropanol. As amostras foram colocadas na rack magnética e incubadas por cinco minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado. Depois foi adicionada a segunda solução de lavagem que continha 500 µl de etanol 80%. Os tubos foram novamente incubados em rack magnética por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os tubos ficaram abertos até o etanol evaporar totalmente. As amostras foram eluídas em 200 µl de água nuclease free. Por fim, foram colocadas em rack magnética e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Para comparar os resultados das extrações as amostras foram submetidas à qPCR. Foram utilizados 10 µl GoTaq® qPCR Master Mix

(Promega, EUA), 0.6 µl de *primers forward e reverse* (tabela 1), 3.8 µl de água e 5 µl de amostra, totalizando 20 µl. As reações foram realizadas no equipamento AriaMx Real-time PCR System (Agilent, EUA) nas condições de um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. A fluorescência foi lida ao final de cada ciclo de extensão. Como controle negativo foi utilizada água nuclease free.

Tabela 1. Primers INVA5 utilizados na qPCR para detecção de *Salmonella*.

Primers qPCR		Tamanho de produto	Referência
INVA5F	GATTTGAAGGCCGGTATTATTG	107 pb	BARBAU-PIEDNOIR et al., 2013
INVA5R	ATAAACTTCATCGCACCGTCA		

4.2. Teste da reação de LAMP.

A reação de LAMP para *Salmonella* foi realizada como descrito por XU et al. (2019). O volume final da reação foi de 25 µl e continha os seguintes reagentes: 2.5 µl de 10X Isothermal Amplification Buffer (New England BioLabs, EUA), 1.4 mM de dNTPs (Promega, EUA), 3 mM de MgSO₄ (New England BioLabs, EUA), 1 µl (8U) da enzima *Bst* 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (New England BioLabs, EUA), 2 µl de amostra e água nuclease free até completar o volume. Os *primers* utilizados (tabela 2) foram desenhados por XU et al. (2019). As concentrações foram 1.6 µM de FIP e BIP, 0.2 µM de F3 e B3, e 0.8 µM de Loop-F e Loop-B. O tempo de reação foi de 60 minutos a temperatura de 65°C, seguida de incubação a 85 °C por 5 minutos. Por fim, adicionou-se 1 µl de SYBR® Green I (Sigma – Aldrich, EUA) diluído a 1:100 para observação dos resultados. As amostras, sob luz UV, que apresentaram coloração verde fluorescente foram consideradas positivas, já as de coloração alaranjada, negativas.

Em uma segunda etapa, foi realizado um teste com o WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (New England BioLabs, EUA). O protocolo seguido foi o disponibilizado pela empresa. Para uma reação de 25 µl foram utilizados 12.5 µl de WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix, 1.6 µM de FIP e BIP; 0.2 µM de F3 e B3; e 0.8 µM de Loop-F e Loop-B, 1 µl de amostra e água nuclease free até completar o volume. O tempo de incubação foi de 30 minutos a 65°C, seguidos por mais 5 minutos a 85°C. O master mix contém

indicador de pH, que lhe proporciona uma coloração rosa. Decorrida a reação, as amostras que apresentaram coloração amarelada indicaram mudança no pH e, portanto, foram consideradas positivas. Já as que permaneceram com a cor rosa, negativas.

Para ambos os testes foram utilizadas diferentes cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., como controles de especificidade, e água nuclease free como controle negativo.

Tabela 2. Primers utilizados para reação de LAMP para detecção de *Salmonella*, conforme descrito por XU et al., 2019.

Primers LAMP	
FIP	GACGACTGGTACTGATCGATAGTTTTTCAACGTTTCCTGCGG
BIP	CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAACCCACCGCCAGG
F3	GGCGATATTGGTGTATTATGGGG
B3	AACGATAAACTGGACCACGG
Loop-F	GACGAAAGAGCGTGGTAATTAAC
Loop-B	GGGCAATTCGTTATTGGCGATAG

4.3. Teste do Número Mais Provável (NMP) associado à LAMP

Para realizar este teste foram utilizadas dez amostras de pele de frango artificialmente contaminadas com *Salmonella* Typhimurium, proveniente do Laboratório de Inspeção Sanitária de Alimentos do Serviço de Orientação a Alimentação Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (SOAP/FMVZ), da UNESP – Botucatu. Inicialmente foi utilizada uma alíquota do cultivo com concentração estimada de 10^8 na escala Nefelométrica de Mc Farland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até obter as concentrações estimadas de 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^0 UFC/ml.

Para comparar as duas técnicas foi realizado o NMP convencional e em cada etapa foram coletadas alíquotas de 5 ml para realização da extração de DNA e, em seguida a LAMP. Para isso, alíquotas dos caldos de enriquecimento foram coletadas em quatro momentos: antes e após a incubação do caldo Água Peptonada Tamponada e após a incubação dos caldos Tetrionato e Rappaport Vassiliadis, conforme descrito na figura 4.

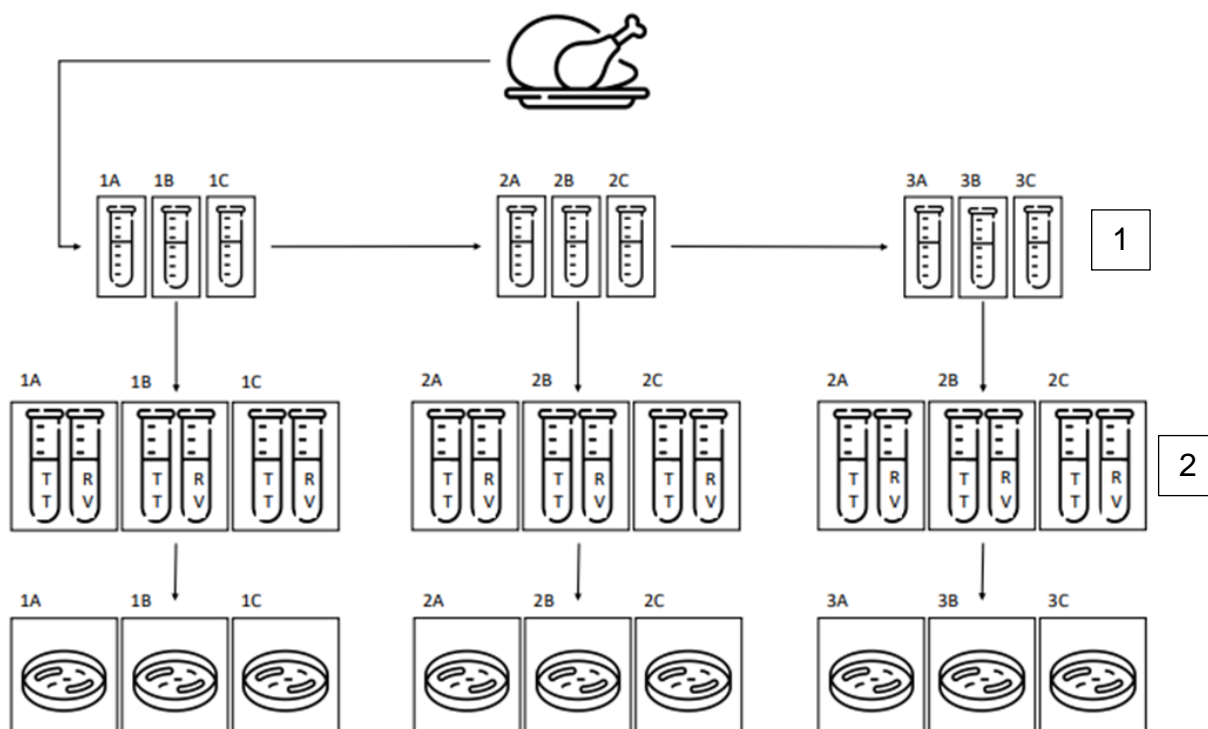


Figura 4. Esquema das etapas do NMP. Como descrito, alíquotas de 5 ml foram coletadas antes de depois da incubação do caldo APT (1) e após a incubação dos caldos TT e RV (2). Fonte: Autora.

Para realizar o NMP, foram pesados 25g de pele de frango, sabidamente negativa, em sacos tipo *Stomacher*. Em seguida foram adicionados 2.5 ml de inóculo e após leve homogeneização, a amostra foi incubada por 30 minutos. Transcorrido o tempo, foram adicionados 225 ml de Água Peptonada Tamponada – APT (Merck) seguido de homogeneização por 2 minutos. Uma alíquota de 5 ml foi retirada neste momento para a realização da LAMP. Em seguida, três alíquotas de 50 ml foram transferidas para tubos cônicos estéreis denominados 1A, 1B e 1C. Posteriormente, foram retirados 5 ml do tubo 1A e transferidos para um novo tubo (2A), contendo 45 ml de APT, que foi homogeneizado por vórtex. Por fim, foram transferidos mais 5 ml do tubo 2A para o tubo 3A que continha 45 ml de APT. O mesmo procedimento foi realizado com as outras repetições (B e C). Os tubos foram então incubados a 36°C por 24 horas. Transcorrida a incubação, foram retidas alíquotas de todas as diluições e repetições para a realização da LAMP. Também foram transferidos 100 µl para 9,9 ml de caldo Rappaport Vassiliadis – RV (Thermo Scientific™ Oxoid™) e 1000 µl para 9 ml do caldo Tetracionato – TT (BD). As amostras foram então incubadas a 42°C por 24 horas. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de

5 ml para LAMP-TT e LAMP-RV e os caldos foram plaqueados em ágar de desoxicolato-lisina-xilose – XLD (Thermo Scientific™ Oxoid™), que foram incubadas a 36°C por 24 horas. Após este período, as placas foram analisadas em buscar de colônias vermelhas com centro preto, que são características de *Salmonella* spp.

Para um resultado positivo no NMP convencional as placas deveriam indicar a presença de *Salmonella* na diluição correspondente, podendo ser positiva para TT, RV ou ambos. Já no NMP-LAMP, os tubos que apresentassem mudança na coloração de rosa para amarelo eram considerados positivos. O número de replicatas positivas em cada diluição foi confrontado na tabela de determinação do NMP, conforme descrito por BLODGETT (2010) (tabela 3).

As amostras foram extraídas por *beads* magnéticas no robô KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Fisher Scientific, EUA) e em seguida foi realizada a técnica de LAMP com o WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA), conforme descrito anteriormente.

Tabela 3. Tabela para análise do Número Mais Provável (NMP). Para 3 séries de 3 tubos, contendo cada série 0.1, 0.01 e 0.001g de inóculo, correlacionados com a tabela de NMP/g e com intervalos de confiança de 95%. Traduzido de BLODGETT (2010).

Tubos positivos			MPN/g	Int. Confiança		Tubos positivos			MPN/g	Int. Confiança	
0.10	0.01	0.001		Mín.	Máx.	0.10	0.01	0.001		Mín.	Máx.
0	0	0	<>	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	-

4.4. Análise estatística

Os dados de NMP obtidos pelas diferentes técnicas foram tabulados e foi feita a análise da distribuição, com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (histograma e gráfico Quantil-Quantil). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as medianas do NMP obtidas com as diferentes técnicas. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $P < 0,05$. Para a análise, os sinais de maior que (>) não foram considerados.

4.5. Estimativa de custo das técnicas

Uma estimativa do custo entre as técnicas de NMP e NMP-LAMP (*kit* comercial e *in house*) foi realizada a fim de obter valor por amostra, em reais. Foram pesquisados os valores médios dos meios e reagentes utilizados que então foram multiplicados pelo volume empregado em cada análise. Ao fim os valores foram somados e obteve-se o custo por amostra. Não foram considerados valores de insumos como tubos, placas e ponteiras.

5. Resultados

5.1. Teste da extração com fervura

A qPCR demonstrou que os valores de Cq (Ciclo de Quantificação) entre os dois tipos de extração foi semelhante para todas as amostras, como é possível observar na tabela e figura 5.

Tabela 4. Valores de Cq na qPCR de isolados de *Salmonella* spp. com DNAs extraídos por diferentes métodos (Beads magnéticas e fervura).

Isolado	Método de Extração	
	Beads	Fervura
1	13,22	10,92
2	12,39	12,98
3	12,03	13,02
4	13,36	13,45
CN	No Cq	No Cq

CN=Controle negativo

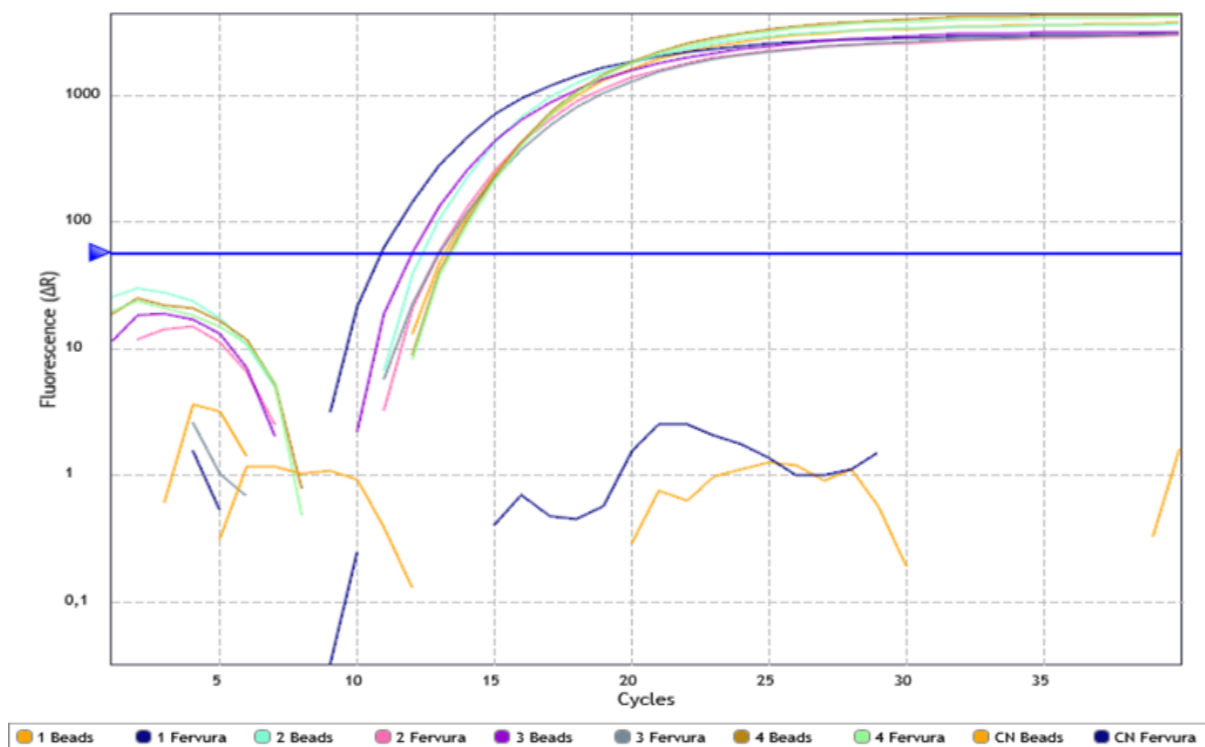


Figura 5. Gráfico das curvas de amplificação para o alvo INVA5.

5.2. Teste da reação de LAMP

Todas as amostras de *Salmonella* spp. testadas foram positivas em ambos os protocolos. Já o controle negativo e as amostras de *E. coli* e *Pseudomonas* permaneceram sem mudanças, caracterizando os resultados como negativos. Os resultados estão contemplados nas imagens 6 e 7.

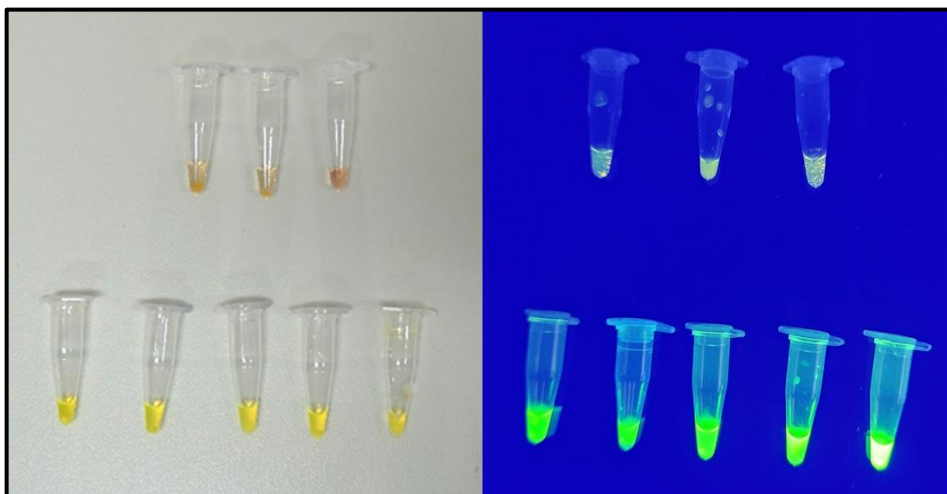


Figura 6. Resultado da reação de LAMP, como descrito por XU et al. (2019). Após a adição do SYBR® Green I, as amostras negativas apresentaram coloração alaranjada. Já as amostras positivas, coloração verde. A direita, os mesmos tubos foram expostos a luz ultravioleta. As amostras positivas exibiram fluorescência.



Figura 7. Resultado da reação de LAMP utilizando o WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix. Os tubos negativos apresentam coloração avermelhada. Já os positivos, coloração amarelada.

5.3. Teste do Número Mais Provável (NMP) associado à LAMP

Na tabela 5 estão dispostos os valores de números mais prováveis das diferentes técnicas. A partir da análise estatística, observou-se que não houve diferença entre o NMP convencional e o NMP-LAMP realizado a partir dos diferentes meios de cultura.

Apenas a amostra 5 apresentou um valor discordante, considerando o intervalo de confiança de 95% para o NMP-LAMP realizado a partir do caldo APT e o NMP convencional.

A LAMP realizada a partir do caldo APT antes da incubação de 24 horas não apresentou nenhum resultado positivo.

Tabela 5. Comparação do NMP obtido através de diferentes técnicas em amostras de carcaça de frangos artificialmente contaminadas com *Salmonella*. Entre parênteses, os intervalos de confiança de cada resultado obtido.

Amostra	NMP convencional	NMP LAMP APT	NMP LAMP TT	NMP LAMP RV	NMP LAMP TT/RV
1	>1100 (420 - -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)
2	>1100 (420 - -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)
3	>1100 (420- -)	1100 (180 - 4100)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)
4	>1100 (420 - -)	>1100 (420 - -)	>1100 (420 - -)	290 (90 - 1000)	>1100 (420 - -)
5	1100 (180-4100)	38 (8,7-110)	1100 (180-4100)	1100 (180-4100)	>1100 (420- -)
6	1100 (180 - 4100)	210 (40 - 430)	1100 (180 - 4100)	1100 (180 - 4100)	1100 (180 - 4100)
7	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)	36 (8,7-94)	460 (90-2000)
8	460 (90-2000)	150 (37-420)	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)
9	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)
10	460 (90-2000)	28 (8,7-94)	28 (8,7-94)	28 (8,7-94)	28 (8,7-94)
11	460 (90-2000)	150 (37 - 420)	460 (90-2000)	460 (90-2000)	460 (90-2000)
12	240 (42-1000)	1100 (180-4100)	1100 (180-4100)	460 (90-2000)	1100 (180-4100)
13	210 (40 - 430)	21 (4,5 - 42)	210 (40 - 430)	35 (8,7 -94)	210 (40 - 430)
14	150 (37 - 420)	93 (18 - 420)	150 (37 - 420)	>1100 (420- -)	>1100 (420- -)
15	93 (18 - 420)	35 (8,7 -94)	43 (9-180)	43 (9-180)	43 (9-180)
16	43 (9-180)	9,2 (1,4-38)	9,2 (1,4-38)	9,2 (1,4-38)	9,2 (1,4-38)
17	23 (4,6-94)	7,4 (1,3-20)	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)
18	3,6 (0,17-18)	11 (3,6-38)	28 (8,7-94)	20 (4,5-42)	35 (8,7-94)
19	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)	3,6 (0,17-18)
Mediana	460	150	460	460	460

NMP = Número Mais Provável convencional, NMP LAMP APT= Número Mais provável associado a técnica de LAMP realizada a partir do caldo Água Peptonada Tamponada, NMP LAMP TT = Número Mais provável associado a técnica de LAMP realizada a partir do caldo Tetrationato, NMP LAMP RV = Número Mais provável associado a técnica de LAMP realizado a partir do caldo Rappaport Vassiliadis, NMP LAMP TT/RV = Número Mais Provável associado a técnica de LAMP considerando os resultados de TT e RV, similar a técnica convencional. Valor P = 0,7587.

5.4. Estimativa de custo

Nas tabelas 10, 11 e 12 encontram-se os valores estimados para cada metodologia. O NMP convencional obteve o custo mais baixo, com R\$41,20 por análise, seguida pelo NMP-LAMP “*in house*”, com R\$ 55,38. O NMP-LAMP com o kit comercial apresentou o maior valor dentre as técnicas, com um valor de R\$143,22 para cada análise realizada.

Tabela 6. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP convencional. (ref. abril de 2022)

NMP Convencional	
Reagente	Preço por análise
APT	R\$4,21
Caldo TT	R\$3,89
Caldo RV	R\$1,93
Ágar XLD	R\$6,63
Agar três açúcares e ferro (TSI)	R\$2,63
Ágar Lisina Ferro (LIA)	R\$2,74
Caldo Ureia	R\$1,60
Soropolivalente	R\$17,58
Total	R\$41,20

Tempo para obtenção de resultado: entre 5 e 7 dias.

Tabela 7. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP-LAMP utilizando o kit comercial (colorimétrico).

NMP-LAMP (kit comercial)	
Reagente	Preço por análise
APT	R\$4,21
<i>Master Mix</i>	R\$127,13
<i>Primers</i>	R\$5,76
Extração (<i>beads</i>)*	R\$ 6,12
Total	R\$143,22

*o custo da extração foi estimado a partir de POSSEBON et al. (2022). Tempo para obtenção de resultados: até 48 horas.

Tabela 8. Estimativa de custo para análise de uma amostra no NMP-LAMP “*in house*”.

NMP-LAMP “<i>in house</i>” (XU et al. 2019)	
Reagente	Preço por análise
APT	R\$4,21
<i>Isothermal Amplification Buffer</i>	R\$0,91
<i>Bst 2.0 Warm Start DNA Polymerase</i>	R\$31,02
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	R\$0,62
Betaína	R\$2,59
<i>Primers</i>	R\$5,76
dNTP	R\$0,89
<i>SYBR Green</i>	R\$3,27
Extração (<i>beads</i>)*	R\$6,12
Total	R\$55,38

*o custo da extração foi estimado a partir de POSSEBON et al. (2022). Tempo para obtenção de resultados: até 48 horas.

6. Discussão

Os dois métodos de extração de *Salmonella* spp. apresentaram resultados semelhantes. A extração por fervura apresenta a vantagem de ser um método barato, já que requer menos equipamentos no laboratório (somente banho-maria e centrífuga) e não requer reagentes de alto custo, apenas água nuclease free (YAMAGISHI et al., 2016). Entretanto, por apresentar várias etapas de centrifugação e aquecimento se torna um método laborioso, principalmente para o processamento de muitas amostras, sendo também mais difícil de ser automatizado. Já o protocolo com *beads* utilizam mais reagentes e outros equipamentos como racks magnéticas, mas pode ter seu protocolo facilmente inserido em robôs, agilizando o processo de extração (BARBOSA et al., 2016). A escolha do método dependerá do número de amostras e dos recursos laboratoriais disponíveis.

A técnica de NMP associada a LAMP mostrou bons resultados e não houve diferença estatística entre o NMP convencional e o NMP-LAMP a partir dos diversos meios de cultura. Outros autores foram bem-sucedidos na união das duas técnicas para pesquisa de patógenos em amostras de água. KANITKAR et al. (2017) desenvolveram um sistema de baixo custo e fácil utilização para quantificação de genes de desalogenase reductiva por meio da união entre o NMP e a LAMP, demonstrando que a união das duas técnicas é eficaz. Já Ahmad et al., 2016, foram capazes de quantificar patógenos em amostras de água em menos de 25 minutos.

A discordância na amostra 5 entre o NMP convencional e o NMP-LAMP APT pode ser explicada pelo fato deste caldo ser um meio de enriquecimento não seletivo, o que pode não ter permitido a recuperação integral da *Salmonella*, já que este caldo permite também o crescimento de outros microrganismos competidores, presentes na microbiota da pele. Produtos crus possuem uma carga microbiana elevada e a recuperação de *Salmonella* nestes casos pode ser prejudicada, pois a competição por nutrientes é acirrada (ZHENG et al., 2013).

Os dados sugerem que é possível realizar a técnica a partir do caldo APT, diminuindo o tempo para obtenção de resultados em pelo menos três dias. Entretanto, para resultados mais acurados, recomenda-se a realização a partir dos caldos de enriquecimento seletivo, como o RV e o TT, uma vez que não

houve discordância entre os resultados do NMP-LAMP a partir deles. Os meios de enriquecimento seletivo contêm substâncias, como selenito e verde brilhante, que limitam o crescimento de outros microrganismos (PRABHAKAR et al., 2021; RALL et al., 2005). Em seu estudo, OLIVEIRA et al., 2003 demonstram que a utilização de meios de enriquecimento seletivo (RV e TT) resultaram em uma maior sensibilidade na PCR. O mesmo não foi observado em caldos não seletivos.

Os resultados negativos na LAMP antes da incubação podem ser explicados pela baixa quantidade de microrganismos na amostra coletada e pela complexidade da matriz alimentar, que possui inibidores tais como, proteínas e gorduras. Sendo assim, se faz necessária uma etapa de pré enriquecimento a fim de recuperar os microrganismos e aumentar a sua quantidade na amostra analisada (BARBOSA et al., 2016).

Ao comparar os efeitos dos protocolos de pré enriquecimento na sensibilidade e especificidade da PCR na detecção de *Salmonella* em carne de frango crua, MYINT et al. (2006) não foram capazes de detectar a bactéria em amostras sem enriquecimento prévio. O mesmo resultado já havia sido encontrado por GOUWS et al. (1998). A detecção por PCR de *Salmonella* diretamente das amostras de alimentos (sem pré enriquecimento) pode ser limitada pela presença de substâncias inibidoras (MYINT et al., 2006).

A técnica de LAMP é amplamente utilizada na detecção de patógenos em alimentos (XIE et al., 2022; NIESSEN et al., 2013; ZHAO et al., 2010). Entretanto, a união entre a técnica de NMP e a LAMP ainda carece de estudos, ainda mais por se tratar de uma metodologia promissora para a indústria de alimentos.

A partir da análise de custos foi possível observar que a técnica de NMP convencional apresentou o menor valor dentre as metodologias analisadas. Entretanto, a diferença entre a técnica convencional e a de NMP com a LAMP “*in house*” foi de apenas R\$ 14,18. O que justificaria o uso do NMP-LAMP, uma vez que o tempo para a obtenção do diagnóstico seria muito menor. A escolha de qual metodologia utilizar (kit colorimétrico ou *in house*) fica a critério da indústria, quanto aos seus recursos e necessidades.

7. Conclusão

As técnicas de extração por *beads* ou fervura e LAMP por kit colorimétrico ou *in house* apresentaram resultados satisfatórios e a escolha do método a ser utilizado dependerá do número de amostras e recursos financeiros e materiais disponíveis.

Os resultados do teste do NMP-LAMP foram robustos, sugerindo que é possível realizar a técnica em um tempo mais curto que o convencional. Entretanto a união destas duas técnicas ainda é pouco explorada, visto que há uma escassez de trabalhos abordando o tema. Em relação aos custos, a técnica de LAMP apresentou valores mais elevados quando comparados ao NMP convencional, mas diferença de valores para a técnica *in house* pode compensar pela obtenção de resultados em menos tempo.

Referências

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2022**. Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em: 03 de maio de 2022.

AHADUZZAMAN, Md et al. A molecular based method for rapid detection of Salmonella spp. in poultry dust samples. **MethodsX**, v. 8, p. 101356, 2021.

BARANCELLI, Giovana Verginia; MARTIN, José Guilherme Prado; PORTO, Ernani. Salmonella em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2012.

BARBAU-PIEDNOIR, Elodie et al. SYBR® Green qPCR Salmonella detection system allowing discrimination at the genus, species and subspecies levels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 22, p. 9811-9824, 2013.

BARBOSA, Cristina et al. DNA extraction: finding the most suitable method. In: **Molecular microbial diagnostic methods**. Academic Press, 2016. p. 135-154.

BARROS, N. E. F.; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 85-92, jan./fev. 2008.

BERCHIERI JR, Â. et al. **Doenças das Aves**. 2ª Edição. Campinas: FACTA, 2009.

BLANC, Paloma Antunes; AZEREDO, Denise Perdomo. A segurança de alimentos no contexto do idoso. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, 2014.

BLODGETT, Robert. Appendix 2: most probable number from serial dilutions. **BAM (Bacteriological Analytical Manual)**, 2010.

BOUKHAROUBA, Aya et al. Simultaneous Detection of Four Main Foodborne Pathogens in Ready-to-Eat Food by Using a Simple and Rapid Multiplex PCR (mPCR) Assay. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 3, p. 1031, 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos-PREBAF. **Manual de Procedimentos**. Primeira versão revisada, julho/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). **Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)**. [S. l.], 6 jan. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa>. Acesso em: 25 set. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil**. Informe 2022. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a->

z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view. Acesso em: 03/08/2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016**. Brasília, DF, Nº 205, 25 de outubro de 2016. Seção 1, p13-16.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 56, de 4 de dezembro de 2007**. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF, 5 de dezembro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003**. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF, 5 nov. 2003.

BRYAN, Frank L. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. **Journal of food protection**, v. 41, n. 10, p. 816-827, 1978.

BUNDIDAMORN, Damkerng; SUPAWASIT, Wannakarn; TREVANICH, Sudsai. A new single-tube platform of melting temperature curve analysis based on multiplex real-time PCR using EvaGreen for simultaneous screening detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli, Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in food. **Food Control**, v. 94, p. 195-204, 2018.

CARDOSO, Angélica Cristina Roque. **Caracterização do perfil dos consumidores de carne de frango**. 2015. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015.

CARDOZO, Stanislau Parreira et al. Identificação de Salmonella sp. em amostras de carcaças e ovos de frangos caipiras comercializados em feiras de Goiânia, Goiás. **Interação**, v. 21, n. 2, p. 49-60, 2021.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. **National Salmonella Surveillance**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html> . Acesso em: 22/10/2021.

CEOLIN, L. V.; LOVATO, M. Principais Enfermidades Infecciosas e Parasitárias em Perus. **O Boletim Informativo do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria, RS. Boletim Informativo Ano 6 - Número 6, outubro de 2012. p 11-18. 2012.

COLLINS, J. D.; WALL, P. G. Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties**, v. 23, n. 2, p. 685-700, 2004.

CORRÊA, D.F. Contaminação por Salmonella em Abatedouros de Aves, Programas de Prevenção e Pontos Críticos de Controle: Revisão de literatura. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade

Federal de Santa Catarina, Curitiba. CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **AgroConab**, Brasília, DF, v. 1, n. 9, out/nov. 2021.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. Manual de extração de DNA. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.

DE ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 741-750, 2021.

FARIA, A. Pandemia tem impacto em outras doenças. **Senado Federal**, 2021. Disponível em: <<https://www12.senado.leg.br/noticias/audios/2021/04/pandemia-tem-impacto-em-outras-doencas>>. Acesso em: 10 maio 2022.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GAST, Richard K.; PORTER JR, Robert E. Salmonella infections. **Diseases of poultry**, p. 717-753, 2020.

GONÇALVES, Daniela da Silva. **Deteção da bactéria Wolbachia em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop)**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

GOUWS, Pieter A.; VISSER, Marinda; BRÖZEL, VOLKER S. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. **Journal of food protection**, v. 61, n. 8, p. 1039-1042, 1998.

HARARI, Yuval Noah. **Sapiens: uma breve história da humanidade**. 38ª Edição. Porto Alegre: L&PM, 2018.

HOELZER, Karin; SWITT, Andrea Isabel Moreno; WIEDMANN, Martin. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary research**, v. 42, n. 1, p. 1-28, 2011.

HUANG, Chenxi et al. Development of a rapid *Salmonella* detection method via phage-conjugated magnetic bead separation coupled with real-time PCR quantification. **LWT**, v. 142, p. 111075, 2021.

KANITKAR, Yogendra H. et al. Most probable number with visual based LAMP for the quantification of reductive dehalogenase genes in groundwater samples. **Journal of microbiological methods**, v. 143, p. 44-49, 2017.

KIRK, Martyn D. et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001921, 2015.

LIU, Dongyou (Ed.). **Handbook of foodborne diseases**. CRC Press, 2018.

LÖFSTRÖM, Charlotta et al. Detection of Salmonella in meat: comparative and interlaboratory validation of a noncomplex and cost-effective pre-PCR protocol. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 1, p. 100-104, 2012.

MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2016.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MENDONÇA, Eliane Pereira. **Disseminação de Salmonella sp. na cadeia produtiva do frango de corte**. Orientador: Daise Aparecida Rosa. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MYINT, M. S. et al. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture. **Food microbiology**, v. 23, n. 6, p. 599-604, 2006.

MOMIN, Kasanchi M. et al. Development of a novel and rapid polymerase spiral reaction (PSR) assay to detect Salmonella in pork and pork products. **Molecular and cellular probes**, v. 50, p. 101510, 2020.

MORGADO, Michele E. et al. Climate change, extreme events, and increased risk of salmonellosis: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004-2014. **Environmental Health**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2021.

MURRAY, Rianna T. et al. Prevalence of private drinking water wells is associated with salmonellosis incidence in Maryland, USA: An ecological analysis using foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) data (2007–2016). **Science of The Total Environment**, v. 787, p. 147682, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIESSEN, Ludwig et al. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. **Food microbiology**, v. 36, n. 2, p. 191-206, 2013.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.

NUNES, Mariana de Lira. **Aplicação da técnica Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

OLIVEIRA, S. D. et al. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for Salmonella detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 217-221, 2003.

PRABHAKAR, Parmanand et al. Performance evaluation of a selective-enrichment-isolation protocol for *Salmonella enterica* from seafood. **Journal of Microbiological Methods**, v. 180, p. 106120, 2021.

PIRES, Sara M. et al. Burden of foodborne diseases: think global, act local. **Current Opinion in Food Science**, 2021.

POSSEBON, Fabio Sossai et al. A fast and cheap in-house magnetic bead RNA extraction method for COVID-19 diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 114414, 2022.

RALL, Vera Lúcia Mores et al. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 147-150, 2005.

RICHTER, Łukasz et al. Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 448-455, 2018.

RISTORI, C. A. et al. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista** (Online), v. 5, n. 52, p. 16-19, 2008.

SANTOS, R. DE L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

SANTOS, Lilian Andriva dos. **Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. na tecnologia de abate de frangos de corte**. 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Ciências Biológicas) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

SILVEIRA, Débora Rodrigues et al. Qualidade microbiológica de produtos de origem animal encaminhados para alimentação escolar. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

TANNER, Nathan A.; ZHANG, Yinhua; EVANS JR, Thomas C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. **Biotechniques**, v. 58, n. 2, p. 59-68, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. 2019. National *Salmonella* Surveillance. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>>. Acesso em: 02/10/2021.

VON RÜCKERT, D. A. S. et al. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 326-330, 2009.

WALDMAN, Jéssica et al. Direct detection of *Salmonella* from poultry samples by DNA isothermal amplification. **British Poultry Science**, p. 1-7, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. World Health Organization, 2015.

XIE, Mei et al. Multiplex detection of foodborne pathogens by real-time loop-mediated isothermal amplification on a digital microfluidic chip. **Food Control**, p. 108824, 2022.

XU, Wenli et al. Establishment and application of polymerase spiral reaction amplification for Salmonella detection in food. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.29, N.10. p. 1543–1552, 2019.

YAMAGISHI, Junya et al. Comparison of boiling and robotics automation method in DNA extraction for metagenomic sequencing of human oral microbes. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154389, 2016.

YAMATOGLI, R. S. et al. Qualitative and quantitative determination and resistance patterns of Salmonella from poultry carcasses. **Journal of food protection**, v. 79, n. 6, p. 950-955, 2016.

ZANINELLI, Rafael Lopes et al. Salmoneloses na produção avícola–revisão bibliográfica. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 154-163, 2019.

ZHAO, Y. et al. Salmonella detection in powdered dairy products using a novel molecular tool. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 5, p. 3480-3496, 2017.

ZHAO, Xihong et al. Development and application of a rapid and simple loop-mediated isothermal amplification method for food-borne Salmonella detection. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 1655-1659, 2010.

ZHENG, Qianwang et al. Comparison of enrichment broths for the recovery of healthy and heat-injured Salmonella typhimurium on raw duck wings. **Journal of food protection**, v. 76, n. 11, p. 1963-1968, 2013.