

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE BOTUCATU

**Perfil sanitário e pesquisa de *Salmonella* em frangos e
lingüiças pela metodologia tradicional e pela PCR.**

Simone Kuba

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas (Modalidade Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Kuba, Simone.

Perfil sanitário e pesquisa de *Salmonella* em frangos e lingüiças pela metodologia tradicional e pela PCR / Simone Kuba. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Vera Lúcia Mores Rall

1. Microbiologia de alimentos 2. *Salmonella*

Palavras-chave: Frango; Indicador higiênico-sanitário; Lingüiça; PCR;
Salmonella

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana e Artur, por tudo o que sempre fizeram e ainda fazem por mim e por nunca deixarem que eu desistisse de lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos, Douglas e Cristiane, por todo apoio e carinho.

À Professora Vera, minha orientadora, agradeço muito tudo o que eu aprendi. Sou muito grata também pela compreensão, paciência e apoio durante um período muito difícil da minha vida.

Ao Nobo, meu namorado, um Anjo que passou a fazer parte da minha vida. Agradeço por todo amor, incentivo e pela paciência de ouvir todas as minhas reclamações.

Aos colegas do Laboratório e do Departamento, especialmente: Camila, Natalia, Lívia, Camila, Renan, Juliana e Carlos.

Ao Professor João Pessoa, pela ajuda na parte de Biologia Molecular e empréstimo dos equipamentos.

À Professora Márcia Guimarães, muito obrigada pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos dos Laboratórios de Virologia e Micologia, pelos equipamentos emprestados para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial: Sonia, Pedro, Tino, Dê e Luís.

À Bê (Tais) e Kyoto (Michele), amigas e companheiras de República, agradeço pela paciência e amizade.

Às amigas e vizinhas, Fung's (Aline), Tomô (Erica), Kib (Tatiana) e Taku (Alice), muito obrigada pela amizade e demonstração de carinho.

E a todos os outros amigos de faculdade, pelos momentos de alegria.

RESUMO

Novos hábitos alimentares da população e as mudanças nos sistemas de produção e distribuição dos alimentos podem estar fortemente relacionados aos casos de doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados por microorganismos. Isso faz com que a preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos aumente mundialmente.

Dentre os principais patógenos, destaca-se a *Salmonella* sp, que pertence à microbiota gástrica de animais silvestres e de animais domésticos criados para o consumo humano (aves, bovinos e suínos). Este fato torna o problema de grande relevância para as autoridades de saúde pública, pois esses microorganismos podem estar associados às infecções ou surtos provocados pela ingestão de alimentos contaminados.

Foram coletadas 35 amostras de lingüiças e 25 cortes de frango, nos principais supermercados do município de Botucatu-SP e avaliados quanto à qualidade higiênico-sanitária através da determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes (CT), além da presença de *Salmonella* sp. Os resultados obtidos mostram que 31% das lingüiças e 84% das amostras de frango estavam fora dos padrões higiênico-sanitários estabelecido pela ANVISA (RDC n° 12), que determina uma quantidade máxima de 5×10^3 CT/g em lingüiça e 10^4 /g em carne de aves. Em relação à *Salmonella* sp, estabeleceu-se a ausência dessa bactéria em 25g de lingüiça e não determina nenhum parâmetro para o frango. Entre as 25 amostras de frango analisadas, duas (8%) foram positivas pela metodologia tradicional. Esse resultado foi confirmado pela PCR, que detectou mais 14 cortes de frango contaminados. Nas lingüiças analisadas, a PCR confirmou a presença de *Salmonella* sp nas quatro amostras (11,43%) que foram positivas pela metodologia tradicional e ainda encontrou outras 18 lingüiças (51,42%) contaminadas.

Esses resultados mostram a necessidade de um maior controle e fiscalização por parte das autoridades de saúde pública, a fim de reduzir a incidência dos patógenos analisados em carne de frango e lingüiças frescas.

Palavras-chave: Frango; Indicador higiênico-sanitário; Lingüiça; PCR; *Salmonella*.

SUMÁRIO

Resumo	1
1) Introdução.....	2
1.1) Doenças Transmitidas por Alimentos.....	3
1.2) <i>Salmonella</i>	8
1.3) Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes.....	11
1.4) Legislação.....	14
1.5) Identificação.....	15
1.5.1) Metodologia Convencional.....	16
1.5.2) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	17
2) Objetivo.....	20
3) Materiais e Métodos.....	22
3.1) Meios de Cultura.....	22
3.2) Coleta das amostras.....	22
3.3) Análises Microbiológicas.....	22
3.3.1) Preparo das amostras e suas diluições.....	22
3.3.2) Determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes.....	23
3.3.3) Detecção da presença <i>Salmonella</i>	23
3.4) Detecção da presença de <i>Salmonella</i> pela PCR.....	24
3.4.1) Extração e Purificação de DNA.....	24
3.4.2) Amplificação do ácido nucléico (PCR).....	24
3.4.3) Eletroforese.....	25
3.5) Análise estatística.....	26
4) Resultados.....	28
5) Discussão.....	32
6) Conclusão.....	37
7) Referências.....	39

INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos é crescente mundialmente, uma vez que a presença de alguns microorganismos pode ser responsável por casos graves de doenças de origem alimentar (MEAD *et al.*, 1999, 2004). Nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*) tem como uma de suas prioridades, a proteção da população contra a contaminação por patógenos em alimentos (HILL, 1996). Dentre as principais bactérias destacam-se a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* e *Listeria monocytogenes* (FDA, 1995).

As mudanças nos sistemas de produção e distribuição dos alimentos e os novos hábitos e preferências alimentares da população mundial são importantes fatores associados aos casos de enfermidades transmitidas por alimentos (MEAD *et al.*, 1999). No Brasil, o preço acessível, a boa qualidade e a praticidade dos produtos oferecidos comercialmente fizeram com que o consumo de frango aumentasse consideravelmente nos últimos 20 anos. O consumo *per capita* passou de 10 kg para 35,4 kg por ano, perdendo apenas para o consumo de carne bovina (36,3 kg) (UBA, 2006). Em terceiro lugar está o consumo de carne suína, que representa 11,3 kg *per capita*, sendo que cerca de 70% dessa carne é comercializada na forma de embutidos, como a lingüiça. (ZOOTEC, 2004).

Os produtos de origem animal são as principais fontes de infecção gastrointestinal transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados (BAEUMLER *et al.*, 2000; LUCEY *et al.*, 2000; BELI *et al.*, 2001). A *Salmonella* está entre os principais patógenos e é freqüente em carnes de aves e ovos (SLAVIK *et al.*, 1995; UYTENDAELE *et al.*, 1998). Segundo Panisello *et al.* (2000), os casos de salmonelose estão associados à manipulação incorreta da carne de aves e seus produtos, além do consumo dessas mal cozidas e de alimentos contendo ovos crus.

As lingüiças são produtos elaborados a partir de carnes de uma ou mais espécies de animais (ENGETECNO, 2008) e classificam-se, de acordo com o tratamento térmico utilizado em sua fabricação, em frescas, cozidas ou defumadas. Podem sofrer variações conforme a origem da matéria prima

(bovina, suína, ovina, de aves, de peixes ou mista) e os temperos utilizados (FERREIRA & CAMPOS, 2000). As lingüiças frescas necessitam de um controle higiênico-sanitário rígido em relação à matéria prima empregada e durante o processo de fabricação, uma vez que não passam por nenhum tratamento térmico, o que reduziria a carga microbiana presente no produto (FERREIRA & CAMPOS, 2000).

Considerando o expressivo aumento no consumo de carne e seus derivados e o alto grau de contaminação desses produtos, é necessário que a qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor seja assegurada. Para isso é de fundamental importância a implantação de uma fiscalização eficiente desde a criação dos animais até o produto chegar ao consumidor final (LUIZ *et al.*, 2004). Além disso, é essencial também que os casos de doenças veiculadas por alimentos sejam notificados às autoridades de saúde pública para que estas possam agir no combate e prevenção das enfermidades (LINDQVIST, *et al.*, 2000).

1.1) DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são provocadas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados. A contaminação pode ocorrer desde a matéria prima até o consumo do produto. Neste processo podem estar envolvidas diversas etapas como o plantio, manipulação, transporte e armazenamento do alimento. Os mecanismos de defesa do patógeno e as condições do alimento (atmosfera, pH e temperatura de acondicionamento inadequada, por exemplo) são fatores que garantem a sua sobrevivência e multiplicação (SVS-MS, 2007). Alimentos de origem animal e aqueles preparados para o consumo coletivo estão entre os principais responsáveis pelos surtos de DTAs. (SVS-MS, 2007)

Existem vários mecanismos patogênicos envolvidos com a determinação das DTAs. De maneira simplificada elas são agrupadas nas seguintes categorias (SVS-MS, 2007):

***Infecções** – caracterizam-se pela ingestão de microorganismos patogênicos invasivos, ou seja, aqueles capazes de penetrar e invadir tecidos e órgãos, originando um quadro clínico característico como as infecções por *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*.

Agentes virais, protozoários e helmintos também estão envolvidos com DTAs, cujo mecanismo de ação é a invasão tecidual.

***Toxinfecções** - são provocadas por toxinas liberadas quando os microrganismos se multiplicam, esporulam ou sofrem lise na luz intestinal. Essas toxinas atuam nos mecanismos de secreção/absorção da mucosa do intestino. As infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (cepa diarréica) são exemplos clássicos.

***Intoxicações** – ocorrem após a ingestão de toxinas formadas em decorrência da intensa proliferação do microorganismo patogênico no alimento. As intoxicações podem ser provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*.

***Intoxicação não bacteriana** - envolve agentes não bacterianos, como metais pesados, agrotóxicos, fungos silvestres, vírus, parasitas, plantas e animais tóxicos (moluscos e peixes). Os mecanismos fisiopatológicos são variáveis, envolvendo ação química direta do próprio agente sobre tecidos ou órgãos específicos.

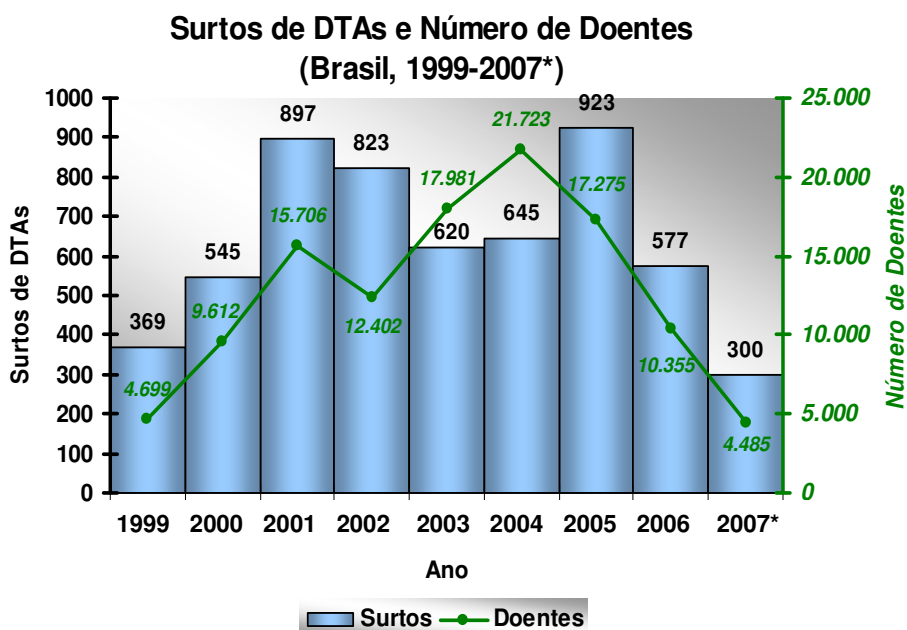
As DTAs estão se transformando em um grave problema econômico e de saúde pública, pois estão entre as grandes causas de morbidade e mortalidade no mundo (MIN.SAÚDE, 2007; SVS-MS, 2007). Sua incidência depende de diversos aspectos como o crescimento da população mundial, processo de urbanização desordenado, aumento da pobreza, deixando grupos populacionais mais vulneráveis, saneamento, grau de educação da população, fatores culturais e ambientais, aumento da importação de alimentos, além da deficiência no controle de qualidade dos produtos alimentícios. (MIN.SAÚDE, 2007; SVS-MS, 2007). Dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que mais de dois milhões de pessoas morrem por doenças diarréicas no mundo anualmente e muitas dessas doenças são provocadas pelo consumo de produtos contaminados. O espectro de patógenos causadores de DTAs tem aumentado nos últimos anos, sendo identificados novos agentes responsáveis por manifestações severas como *Escherichia coli* O157:H7, *Streptococcus zooepidermidis* e ácido domóico, um neurotransmissor não fisiológico relacionado com um surto de intoxicação amnésica. Outros agentes voltaram a causar epidemias mundiais como o *Vibrio cholerae* O1

toxigênico. Além disso, há também registros de síndromes pós-infecção reconhecidas como importantes seqüelas de DTAs, como a Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) após infecção por *Escherichia coli* O157:H7, Síndrome de Reiter após salmonelose e campilobacteriose, Guillain-Barré após infecção por bactérias do gênero *Campylobacter*, nefrite após infecção por *Streptococcus zooepidermidis* e malformações congênitas por toxoplasmose (SVS-MS, 2007). Estima-se que, nos Estados Unidos, ocorram aproximadamente 76 milhões de casos por ano de doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados por patógenos (MEAD *et al.*, 1999; CDC, 2001). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, mais de 300 mil pessoas são hospitalizadas e mais de 5 mil pacientes, principalmente crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos, morrem anualmente vítimas desse tipo de doença (CDC, 2001). Mead *et al.* (1999), nos Estados Unidos, relataram que 1,4 milhões dos casos são provocados por sorotipos de *Salmonella* não-tifóide e que 2,4 milhões de casos têm como agente etiológico o *Campylobacter* sp. *Escherichia coli* patogênica, incluindo a *E. coli* O157:H7, são responsáveis por cerca de 270 mil casos anualmente .

No Brasil, a vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos (VE-DTA) é realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde –SVS– desde 1999. Porém, somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados confiáveis sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais freqüentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (SVS-MS, 2007). A inexistência de centros regionais especializados na organização de dados epidemiológicos relacionados às DTAs, a subnotificação desses casos às autoridades de saúde pública e sistemas impróprios de fiscalização alimentar contribuem para que o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos ainda seja pouco conhecido no país. (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

Os registros brasileiros são baseados em grandes surtos de DTAs e não em casos individuais das diferentes doença. De 1999 a outubro de 2007 foram registrados 5.699 surtos em todo o país (Figura 1), e em somente 2.833 casos (49,7%), os agentes etiológicos foram identificados. Desses surtos, 83,5% foram provocados por algum tipo de bactéria e o restante, esteve distribuído

entre vírus (14,1%), parasitas (1,1%) e agentes químicos (1,3%) (MIN.SAÚDE, 2007).



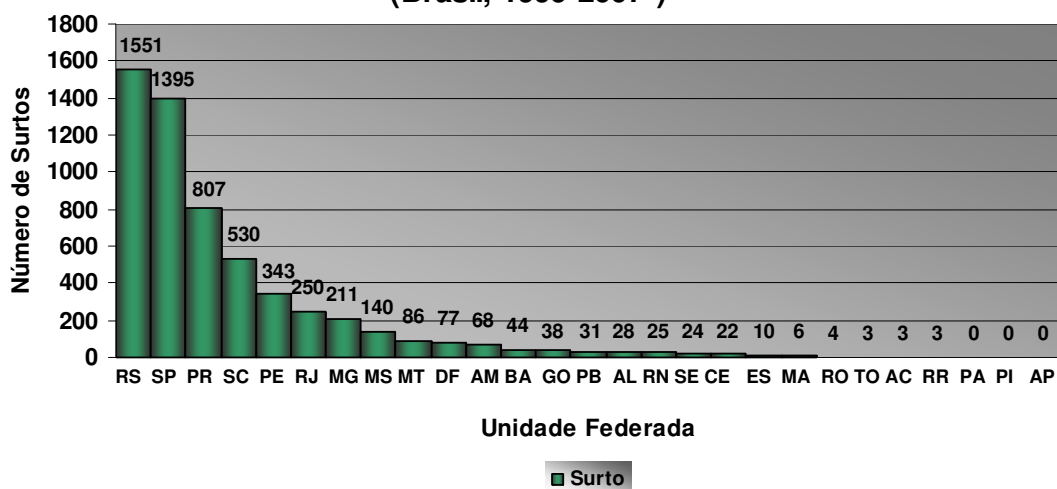
(Figura 1) Surtos de DTAs nos anos de 1999 a 2007* e número de pacientes envolvidos

Fonte: COVEH/CGDT/ DEVEP/ SVS - Min. Saúde
*Última atualização: Outubro de 2007

A SVS calcula que ocorram, em média, 665 surtos com aproximadamente 13 mil doentes anualmente no Brasil. Até o ano de 2007, os Estados das regiões Sul e Sudeste, com destaque para o Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, foram os que apresentaram o maior registro de surtos, fato que pode estar relacionado com a melhor implantação do sistema de VE-DTA nos municípios. Juntas, essas duas regiões notificaram 85% dos surtos de DTAs. (MIN SAÚDE, 2007). (Figura 2)

As doenças transmitidas por alimentos podem ser provocadas por diferentes agentes etiológicos. Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes dependem do tipo de patógeno e muitos deles produzem os mesmos sintomas, o que dificulta o diagnóstico clínico. Os mais comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. (MIN. SAÚDE, 2007).

Surtos de DTAs por Unidade Federada (Brasil, 1999-2007*)



(Figura 2) Surtos de DTAs por Unidade Federada no Brasil, no período de 1999 a 2007*

Fonte: COVEH/CGDT/ DEVEP/ SVS - Min. Saúde
*Última atualização: Outubro de 2007

O tratamento depende da sintomatologia apresentada pelo doente, porém a reposição de fluidos e eletrólitos, através da ingestão de líquidos, é extremamente importante para evitar a desidratação do indivíduo. Os exames laboratoriais devem ser realizados de acordo com as hipóteses diagnósticas. E como os surtos, em geral, são provocados por bactérias, é indicado realizar cultura das fezes e dos alimentos suspeitos para identificar o patógeno, proporcionando o melhor tratamento para o paciente (MIN. SAÚDE, 2007)

O Ministério da Saúde (2007) determina que todo surto seja notificado às autoridades de saúde locais e investigado imediatamente a fim de que todas as medidas de combate e controle da doença sejam tomadas. A investigação do surto é realizada em conjunto com a Vigilância Sanitária através da inspeção do estabelecimento de origem do alimento suspeito. A coleta das amostras de água, alimento e quando necessário, o “swab” dos utensílios e superfícies são realizados durante a investigação sanitária.

1.2) *SALMONELLA*

O gênero *Salmonella* apresenta-se como bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos e pertencentes à família Enterobacteriaceae (OHL & MILLER, 2001). São microrganismos anaeróbios facultativos e a temperatura ideal para seu crescimento varia de 35° C a 37° C (LUIZ *et al.*, 2004). A presença de flagelo é uma característica da maioria das espécies, com exceção de *Salmonella Pullorum* e *S. Gallinarum* (FRANCO & LANDGRAF, 1996; MEAD, 2004). O flagelo dá mobilidade à bactéria e permite que ela penetre no alimento e sobreviva às condições adversas do ambiente (MEAD,2004). Esses microrganismos colonizam o trato intestinal do homem e de animais silvestres e domésticos (aves, suínos, bovinos e eqüinos) (FRANCO & LANDGRAF, 1996; NIELSEN *et al.*, 1997; PENNER, 1998; MENG & DOYLE. 1998; DELAZARI,1998; CDC, 2001). As aves podem estar infectadas pelo patógeno e excretá-lo continuamente nas fezes sem apresentar nenhum sintoma que evidencie a infecção. Problema de extrema importância para os avicultores, pois pode causar contaminações cruzadas nos abatedouros, resultando em grandes prejuízos para os criadores (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A classificação de *Salmonella* divide o gênero em tipos sorológico de acordo com a composição de seus antígenos de superfície. O antígeno somático (O) localiza-se na porção lipopolissacarídica da membrana externa do microrganismo, o antígeno flagelar (H) é espécie-específico e tem natureza protéica e o antígeno capsular (Vi), que está presente apenas nas espécies *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Hirschfeldii* (FRANCO & LANDGRAF, 1996)

As febres tifóide e entérica e as enterocolites (salmoneloses) são três grupos de doenças provocados por diferentes sorotipos, através do consumo de alimentos e água contaminados. A febre tifóide tem como agente etiológico, a *S.Typhi*, pode durar de uma a oito semanas e caracteriza-se por febre alta, diarreia, vômitos e septicemia, nos casos mais graves. A *S. Paratyphi* (A, B e C), são responsáveis pela febre entérica, produzem sintomas semelhantes aos da febre tifóide, porém de forma mais branda, deixando o indivíduo debilitado por até três semanas (FRANCO & LANDGRAF, 1996). A salmonelose caracteriza-se pela ocorrência de diarreia, vômito, febre e dor abdominal (PERESI *et al.*, 1998; MILLER & PEGUES, 2000). Esses sintomas aparecem,

em média, de 18 a 36 horas após o contato com o patógeno e duram aproximadamente sete dias (SVS-MS, 2007) (Tabela 1). A maioria dos pacientes recupera-se sem a necessidade de um tratamento específico, porém crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos devem receber atenção especial, pois as enterocolites podem se agravar com a multiplicação da bactéria no sangue (septicemia) e ainda atingir outros órgãos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; CDC, 2001). A Artrite Reativa, um tipo de Inflamação das articulações e a Síndrome de Reiter, que se caracteriza pelo acometimento mucocutâneo, ungueal e ocular, além de episódios de artrite, têm sido relacionadas a casos de infecções gastrointestinais provocadas por *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, algumas espécies de *Campylobacter* e *Clostridium difficile* (TRULL *et al.*, 1986; PUTTERMAN & RUBINOW, 1993). Acredita-se que a Artrite Reativa esteja associada de 0,2% a 7,3% das complicações em casos de salmoneloses (TRULL *et al.*, 1986; INMAN *et al.*, 1988). Não existem ainda dados precisos sobre a incidência da Síndrome de Reiter após uma infecção por *Salmonella* (DWORKIN *et al.*, 2001).

A *Salmonella* pode ser um contaminante encontrado na água e, principalmente, em produtos de origem animal como carne (bovina, suína ou de aves), leite ou ovos. Alimentos que contêm o patógeno não apresentam alterações em relação à cor, odor ou sabor (CDC, 2001). A forma de contaminação mais comum ocorre pelo consumo dos alimentos crus ou mal cozidos, uma vez que o microrganismo é eliminado através do cozimento adequado (FRANCO & LANDGRAF, 1996; CDC, 2001). Outra maneira de infecção é a contaminação cruzada com outros produtos e a manipulação inadequada do alimento (CDC, 2001).

No final da década de 70, a *Salmonella* Enteritidis passou a ser relacionada aos surtos de salmoneloses nos Estados Unidos e em alguns países europeus. Desde então, se tornou o principal sorotipo associado às gastroenterites provocadas pelo consumo de produtos contaminados (PERESI *et al.*, 1998). Nos EUA, foram notificados 504 surtos por *S. Enteritidis*, com 18.195 doentes, entre os anos de 1985 a 1993. Desses, 10,9% (1.978) foram hospitalizados e 0,34% (62) pacientes morreram (CDC, 1994). Na Itália, no período de 1991-1994, ocorreram 1.379 surtos por *Salmonella*, dentre os quais 473 foram causados por *S. Enteritidis* (SCUDERI *et al.*, 1996).

Agente	Fatores Contribuintes pela Infecção e Alimentos Incrimináveis	Período de Incubação (Latência)	Sinais e Sintomas	Amostras Biológicas para Diagnóstico
<p><i>Salmonella</i> sp (<i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i>)</p>	<p>Refrigeração insuficiente, armazenamento a temperaturas elevadas (incubação bacteriana), cocção e reaquecimento inapropriados, preparo dos alimentos várias horas antes de servi-los. Contaminação cruzada, falta de higiene da equipe, trabalhadores infectados que manipulam alimentos cozidos, produtos de fontes contaminadas. Carne bovina, suína, aves e seus produtos e outros alimentos contaminados.</p>	<p>6 a 72 horas (geralmente de 18 a 36 horas)</p>	<p>Dores abdominais, diarreia, calafrios, febre, náuseas, vômitos e mal-estar. Artrite Reativa e Síndrome de Reiter podem ser algumas das seqüelas nos casos mais graves da infecção.</p>	<p>Fezes, swab retal</p>
<p><i>Escherichia coli</i>: Enterotoxigênica (ETEC) Enteroinvasiva (EIEC)</p>	<p>Cocção inadequada dos alimentos, manipulação por pessoas infectadas, uso de água contaminada para lavagem, preparo ou refrescagem dos alimentos, refrigeração insuficiente.</p>	<p>12 a 36 horas (ETEC) 16 a 48 horas (EIEC)</p>	<p>Dores abdominais, diarreia, calafrios, febre, náuseas, vômitos, calafrios, cefaléia e mialgia.</p>	<p>Fezes, swab retal</p>
<p><i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC): <i>E. coli</i> O157:H7</p>	<p>Cocção inadequada dos alimentos, manipulação por pessoas infectadas, uso de água contaminada para lavagem, preparo ou refrescagem dos alimentos, refrigeração insuficiente. Consumo de carne mal cozida, leite cru.</p>	<p>4 a 8 dias</p>	<p>Dores abdominais, diarreia, calafrios, febre, náuseas, vômitos, calafrios, cefaléia e mialgia. No caso da EHEC as fezes podem se apresentar sanguinolentas com posterior aparecimento da Síndrome Hemolítico Urêmica e Trombocitopenia.</p>	<p>Fezes, swab retal</p>

(Tabela 1) Identificação do patógeno conforme período de incubação e principais manifestações
Fonte: Min. Saúde - SVS.

No Brasil, este é um importante sorotipo isolado de amostras humanas e não-humanas, sendo um dos principais responsáveis pelas infecções de origem alimentar (PERESI *et al.*, 1998; SILVA & DUARTE, 2002). Um estudo realizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, entre 1970 e 1990, mostrou que a *S. Enteritidis* foi identificada em apenas 0,37% das 28.658 amostras humanas e em 0,85% das 14.345 amostras não-humanas (TAUNAY *et al.*, 1996). Em continuidade a essa pesquisa, no período de 1991 a 1995, a prevalência de *S. Enteritidis* em fontes humanas passou de 1,2% para 64,9% e em amostras não-humanas esse valor passou de zero para 40,7%. (TAVECHIO *et al.*, 1996). Acredita-se que esse aumento tenha ocorrido, a partir do final da década de 80, com a entrada, no país, de material genético avícola contaminado proveniente dos EUA e alguns países da Europa (IRINO *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997; TAVECHIO *et al.*, 1996).

Em alimentos de origem animal, Ranucci *et al.* (2004), na Itália, ao analisarem 25 lingüiças, encontraram duas amostras (8%) contaminadas. Em 2003, em um estudo realizado no Brasil nenhuma das 56 amostras de lingüiças continham o patógeno (SALVATORI *et al.* 2003). Em relação ao frango, Zhao *et al.* (2001), constataram que nove (4,2%) das 212 amostras de frango estavam contaminadas. No Brasil, realizado com 150 carcaças de frango demonstrou que 32% eram positivas para *Salmonella* (SANTOS *et al.*, 2000).

1.3) COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES

O grupo denominado coliformes totais compreende alguns gêneros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (FRAZIER, 1976; SILVA & JUNQUEIRA, 1995), que quando incubados à 35°C a 37°C/ 48 horas, têm a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás (FRANCO & LANDGRAF, 1996; HITCHINS *et al.*, 1996; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; SILVA *et al.*, 1997). As bactérias pertencentes a esse grupo são bacilos Gram-negativos, não formam esporos, (FRANCO & LANDGRAF, 1996) tem como habitat o trato gastrointestinal do homem e outros animais e podem sobreviver por longos períodos em ambientes não fecais (PARDI *et al.*, 1995; VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1996). Eles podem também ser encontrados em outros ambientes como no solo e em frutas e vegetais (FRANCO & LANDGRAF, 1996; SPLITTSTOESSER *et al.*, 1980). Os

níveis de coliformes totais nos alimentos são utilizados para avaliar as condições higiênicas dos produtos (SIQUEIRA, 1995; DELAZARI, 1995), mas, pelo fato de sobreviverem em ambientes não fecais, não são usados como parâmetro para a análise de contaminação fecal recente ou presença de enteropatógenos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O termo coliformes termotolerantes (CT) também define as bactérias da família Enterobacteriaceae, capazes de produzir gás a partir da fermentação da lactose à 44,5°C a 45,5°C / 24 horas (SILVA & JUNQUEIRA, 1995; HITCHINS *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1997). Entre os coliformes totais, apenas algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* suportam essa temperatura, enquanto 90% das cepas de *Escherichia coli* conseguem sobreviver a estas condições (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Assim como os coliformes totais, este grupo de bactérias também coloniza o trato intestinal de diversos animais, incluindo o homem. No entanto, a presença destes microrganismos em alimentos permite avaliar as condições higiênico-sanitárias dos produtos, uma vez que eles indicam a contaminação fecal e a possível presença de patógenos, e a *E. coli* é a principal representante desse grupo (PARDI *et al.*, 1995; SIQUEIRA, 1995).

Escherichia coli compreende um grande sorogrupo, sendo a minoria patogênica (CDC, 2000). Apresentam em sua superfície, antígenos específicos utilizados em sua identificação. O antígeno somático O relaciona-se aos lipopolissacarídeos de membrana, as proteínas do flagelo estão associadas ao antígeno flagelares H e o antígeno K está relacionado aos polissacarídeos capsulares (TRABULSI *et al.*, 2005).

A classificação das linhagens de *E.coli* leva em consideração os fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia. De acordo com esse critério o grupo é dividido em cinco classes principais: *E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteroagregativa (EAaggEC) e *E.coli* entero-hemorrágica (EHEC) (TRABULSI *et al.*, 2005).

***E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC)**

Corresponde ao sorotipo responsável por casos de diarreia em crianças com menos de um ano de idade (diarreia infantil). O reservatório desse grupo de bactérias é o próprio homem, sendo que as crianças com diarreia são as principais fontes de infecção. Os mecanismos de transmissão ainda não são

bem conhecidos. Em ambientes coletivos como hospitais, berçários e creches o contato pessoal é a mais importante forma de transmissão (TRABULSI *et al.*, 2005).

***E.coli* enteroinvasora (EIEC)**

As EIEC apresentam muitas características bioquímicas, antigênicas, genéticas e patogênicas em comum com a *Shigella*. A infecção intestinal provocada por essas bactérias caracteriza-se pela inflamação e necrose da mucosa do cólon. Clinicamente, o paciente infectado por uma EIEC pode apresentar diarréia sanguinolenta, dores abdominais e febre. A transmissão ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados ou por contato pessoal. A doença aparece com maior freqüência em crianças e adultos (TRABULSI *et al.*, 2005).

***E.coli* enterotoxigênica (ETEC)**

Compreende o grupo de *E. coli* produtor de enterotoxinas termolábeis e termoestáveis. Algumas cepas são capazes de produzir ambas as toxinas, já outras produzem apenas uma delas. As ETEC aderem às células da mucosa intestinal sem penetrar no epitélio, provocando assim uma infecção superficial. Devido a este fato, as fezes dos indivíduos afetados não apresentam indícios de sangue, muco ou leucócitos. Atinge tanto crianças como adultos e sua principal forma de transmissão é o consumo de água ou alimentos contaminados (TRABULSI *et al.*, 2005).

***E.coli* enteroagregativa (EAggEC)**

A denominação deste grupo deve-se ao padrão de adesão à mucosa intestinal, que ocorre através de fimbrias. Algumas cepas de EAggEC também produzem toxinas termoestáveis (EAST-I) e um outro grupo de toxinas relacionado antígenicamente com uma hemolisina de *E.coli*. Sua identificação ocorre através do padrão de adesão em cultura de células, por sondas genéticas ou pela PCR (TRABULSI *et al.*, 2005).

***E.coli* entero-hemorrágica (EHEC)**

Até pouco tempo atrás, as *E.coli* não eram consideradas as grandes responsáveis pelos casos de gastroenterites em países desenvolvidos (MENG *et al.*, 1998). As EHEC, também conhecidas por STEC (*Shiga toxin-producing*) ou VTEC (*E.coli* verocitotóxica), devido as duas citotoxinas que produzem (toxinas *Shiga-Like I e II* ou verotoxinas I e II), formam a classe mais comum nos casos

de diarreia sanguinolenta nos Estados Unidos (MENG *et al.*, 1998; CDC, 2000), sendo o sorotipo O157:H7, o mais caracterizado e mais comumente encontrado nos casos de infecção intestinal (TRABULSI *et al.*, 2005). A *E. coli* O157:H7 pode causar diarreia branda ou sanguinolenta (colite hemorrágica), vômito e febre baixa (CDC, 2000; MEAD, 2004; TRABULSI *et al.*, 2005). O período de incubação do patógeno no hospedeiro varia de quatro a oito dias e o paciente recupera-se em aproximadamente uma semana (SVS-MS, 2007) (Tabela 1). Crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos são os mais susceptíveis a desenvolver os casos mais graves da doença além de suas complicações, como a Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (BOYCE, 1995; CDC, 2000; TRABULSI *et al.*, 2005). Estima-se que a *E. coli* O157:H7 seja responsável por 21.000 casos de infecção intestinal, nos Estados Unidos, onde 23% de pacientes são hospitalizados e 1,2% morrem (BOYCE, 1995). Estudos mostraram que de 5 a 10% dos enfermos desenvolveram a HUS (BOYCE, 1995; CDC, 2000; TRABULSI *et al.*, 2005). Esta síndrome caracteriza-se por anemia hemolítica, mau funcionamento dos rins e trombocitopenia (CDC, 2000; TRABULSI *et al.*, 2005). A contaminação pela *E. coli* O157:H7 ocorre através do consumo de alimentos contaminados, principalmente produtos de origem animal, como carne bovina, leite e derivados não pasteurizados (CDC, 2000).

O diagnóstico das infecções provocadas por *E. coli*, geralmente é realizado através da cultura de fezes do paciente. A identificação do sorotipo é mais específica e baseia-se nos sintomas observados e investigação da produção de algum tipo de toxina ou uma característica particular do microrganismo (CDC, 2000; TRABULSI *et al.*, 2005). Não há um tratamento específico para a doença e nem a necessidade do uso de antibióticos, recomenda-se apenas a ingestão de grande quantidade de líquidos para evitar a desidratação do paciente (CDC, 2000). (Tabela 1).

1.4) LEGISLAÇÃO

Cada país determina, através de legislação própria, o limite do patógeno para os diferentes tipos de alimentos (SALVATORI *et al.*, 2003). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à proteção da saúde da população e a

regulamentação dos padrões microbiológicos dos produtos alimentícios, aprovou, em 2001, o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (RDC nº 12), compatível com as resoluções vigentes no Mercosul, e estabelecendo padrões higiênico-sanitários em alimentos (ANVISA, 2001).

Conforme a RDC nº12, os padrões microbiológicos e sanitários variam de acordo com o tipo de alimento analisado. Caso o produto em pesquisa não esteja caracterizado pela Regulamentação, deve-se considerar a similaridade da natureza ou forma de processamento do produto para sua avaliação.

A avaliação e determinação das condições microbiológicas dos produtos destinados ao consumo humano são realizadas através da comparação dos resultados obtidos nas análises com os valores e parâmetros estabelecidos pela Resolução. De acordo com a interpretação dos resultados os produtos são classificados em:

- Condições sanitárias satisfatórias: os valores obtidos estão abaixo ou igual ao estabelecido pela legislação em vigor.

- Condições sanitárias insatisfatórias: os valores obtidos estão acima do limite permitido, podendo apresentar microorganismos patogênicos ou suas toxinas.

Em relação aos coliformes termotolerantes, a legislação brasileira permite até 10^4 de CT por grama de alimento analisado para carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) e 5×10^3 de CT por grama de alimento para embutidos frescos (lingüiças cruas e similares). Para a maior parte dos produtos do gênero alimentício, o parâmetro estabelecido para a *Salmonella* sp é a sua ausência em 25 gramas de alimento. No entanto, para carnes de aves resfriadas, congeladas ou *in natura* (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) esse item não é exigido (ANVISA, 2001).

1.5) IDENTIFICAÇÃO

Os métodos convencionais de plaqueamento ainda são amplamente utilizados na identificação de patógenos em alimentos (SANTOS *et al.*, 2001). No entanto, essa técnica é trabalhosa e demorada, levando em torno de sete dias para isolamento e identificação do microrganismo (ANDREW *et al.*, 2003; MALLINSON & SNOEYENBOS, 1989; UYTENDAELE *et al.*, 2003). Além

disso, a metodologia tradicional apresenta menor sensibilidade para a detecção de patógenos em amostras com baixo índice de contaminação (D'AOUST, 1992). A necessidade de diagnósticos mais rápidos e precisos aliados à modernização tem criado novas técnicas e novos equipamentos que podem ser utilizados na detecção de microrganismos patogênicos. A reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) é um exemplo disso, e devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade, está sendo largamente empregada na detecção de inúmeros microrganismos, como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *E.coli* e *Salmonella* (STONE *et al.*, 1994; CANDRIAN, 1995; SANTOS *et al.*, 2001).

1.5.1) METODOLOGIA CONVENCIONAL

Os métodos convencionais utilizam diferentes tipos de meios de cultura sendo alguns deles de uso geral, como o caldo infusão cérebro coração (BHI) utilizado para cultivo de microrganismos em geral e outros, mais específicos e seletivos, para a identificação de determinada bactéria, como o ágar *Salmonella-Shigella* (SS), um meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella* e *Shigella* (SILVA *et al.*, 1997).

As técnicas tradicionais de detecção de microrganismos incluem diversas etapas (SOCKETT, 1991). Na contagem de coliformes totais e termotolerantes, por exemplo, utiliza-se a água peptonada tamponada para a homogeneização da amostra e preparo das diluições. Cada diluição é adicionada ao caldo lauril sulfato triptose, um meio seletivo para detecção presuntiva de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E.coli*, pelo método do Número mais Provável (NMP). O caldo *E.coli* (EC) é utilizado para a confirmação dos resultados obtidos na fase presuntiva (SILVA *et al.*, 1997).

Para detecção e confirmação de um alimento suspeito de contaminação por de *Salmonella* são necessários, aproximadamente, sete dias consecutivos de análises. Neste processo incluem-se a incubação da amostra em meios de pré-enriquecimento não seletivos seguida de incubação em caldos seletivos de enriquecimento e plaqueamento em ágar seletivo e diferencial. Após essas etapas, iniciam-se os testes bioquímicos e sorológicos, para a confirmação da *Salmonella* (BENNETT, *et al.*, 1998; SOCKETT, 1991).

1.5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Desde meados da década de 80, quando começou a ser utilizada, a PCR tem provado ser uma técnica extremamente eficaz na detecção de patógenos em alimentos (LANTZ *et al.*, 1994; HILL,1996). A PCR permite a replicação *in vitro* de seqüências definidas de DNA, sendo desnecessário o conhecimento da estrutura completa do DNA alvo, mas apenas de regiões próximas àquela a ser amplificada (MULLIS *et al.*, 1986). Os oligonucleotídios iniciadores ou *primers* são estruturas construídas baseadas em uma pequena porção do DNA próxima à região que se pretende estudar, sendo essas estruturas que darão início à amplificação do DNA (MULLIS *et al.*, 1986). Pelo fato de detectar uma única região do genoma bacteriano, a PCR demonstra maior especificidade quando comparadas aos métodos microbiológicos convencionais (COHEN *et al.* 1994). Outra vantagem no uso dessa técnica está na sua alta sensibilidade, que permite detectar pequenas quantidades do patógeno no produto.

No entanto, a PCR também apresenta algumas desvantagens quanto a sua utilização. A escolha do *primer* (iniciador) adequado é um fator que garante viabilidade da técnica. Este deve ligar-se de forma precisa e específica à região do DNA a ser amplificada (SANTOS *et al.*, 2001). Um exemplo disso pode ser observado na detecção de salmonelas. Em 1997, Baeumler *et al.* relataram o uso de diversos *primers* na detecção de *Salmonella*, como o *InvA*, *agfA*, *IS200*, *H-li*, *spvR* entre outros, e citaram a especificidade de cada um como a principal diferença entre eles, sendo o *InvA* o mais eficiente. Segundo Stone *et al.* (1994), a região selecionada deve ser comum para a maior parte das cepas, além de codificar proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros microrganismos, evitando o aparecimento de resultados falso-positivos.

Outro problema encontrado no uso da PCR para a detecção de microrganismos patogênicos em alimentos é a presença de substâncias e outros componentes que podem reduzir a eficácia e a sensibilidade da técnica (LANTZ *et al.*,1994). A PCR também incapaz de diferenciar células vivas das células mortas (HILL, 1996). Assim, é necessário utilizar procedimentos para isolar e purificar o DNA, eliminando possíveis interferentes (IBRAHIN *et*

al.,1992; TSAI *et al*, 1993; SONG *et al.*, 1993; LANTZ *et al.*, 1994; BULTE & JAKOB., 1995).

OBJETIVO

2) OBJETIVO

Este projeto teve como objetivo a avaliação das condições higiênico-sanitárias e a análise microbiológica da carne de frango e de diversos tipos de lingüiças frescas comercializadas nos principais supermercados do município de Botucatu no Estado de São Paulo. A qualidade higiênico-sanitária foi avaliada através da determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes.

Os alimentos foram analisados também quanto à presença a *Salmonella* sp, comparando-se a metodologia convencional e a PCR, na detecção da patógeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura utilizados, com exceção dos meios ágar *Salmonella – Shigella* (SS - Difco) , ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD - Difco) e caldos Rappaport-Vassiliadis (Difco) e Tetrionato (Difco), foram preparados com antecedência, esterilizados por 15 minutos a 121°C e estocados em câmara fria (3,5° a 4° C).

O ágar SS e o ágar XLD não necessitam de esterilização e foram preparados 24 horas antes do uso e armazenados em estufa de 35°C para secagem e verificação de uma possível contaminação. O caldo Rappaport-Vassiliadis foi diluído nas proporções recomendadas pelo fabricante, autoclavado a 115°C por 15 minutos e mantido em câmara fria até o uso. E o caldo Tetrionato não era autoclavado e após seu preparo foram adicionados uma solução de Verde Brilhante 0,1%.

3.2) COLETA DAS AMOSTRAS

Entre os meses de agosto de 2007 e fevereiro de 2008 foram coletadas 60 amostras, sendo 35 de lingüiças frescas e 25 cortes de frango, nas principais redes de supermercados do município de Botucatu (São Paulo).

As amostras foram mantidas em suas embalagens de comercialização e transportadas ao laboratório em caixa térmica. No laboratório, os produtos previamente identificados, quanto à marca, estabelecimento de origem e datas de embalagem e vencimento, eram armazenados a 4°C até o início das análises.

3.3) ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.3.1) PREPARO DAS AMOSTRAS E SUAS DILUIÇÕES (APHA, 2001)

As amostras foram pesadas em sacos plásticos esterilizados, no qual se colocava 25 g da amostra e 225 ml de água peptonada tamponada (Difco) para homogeneização no *Stomacher Lab Blender 400* por trinta segundos. O homogeneizado (concentração 10⁻¹) foi transferido para um frasco de vidro esterilizado.

As diluições seriadas decimais foram preparadas a partir da diluição inicial (10^{-1}), acrescentando-se 1 ml a um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina estéril, formando a diluição 10^{-2} . A diluição 10^{-3} , foi obtida acrescentando 1 ml da solução 10^{-2} em outro tubo de salina e assim sucessivamente até obterem-se as diluições desejadas. Para as amostras de lingüiça foram utilizadas diluições até 10^{-4} e para os cortes de frango, 10^{-5} .

3.3.2) DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (CT), 1 ml de cada diluição foi inoculada em tubos de ensaio contendo um tubo de Durhan invertido e 10ml de Lauril Sulfato (Difco), em uma série de três tubos por diluição. Os tubos foram incubados a 35°C por um período de até 48 horas. Nos tubos positivos foram observados a turvação do meio e a produção de gás dentro do tubo de Durhan. Para a confirmação de CT, cada tubo positivos foi repicado em tubos de ensaio com o tubo de Durhan invertido e 5 ml de caldo E.C. (Difco), que foram incubados por 24 horas à temperatura de 45°C . A leitura foi igual à realizada para o caldo Lauril. Anotaram-se as quantidades de tubos positivos por diluição e, com o auxílio da tabela de NMP, determinou-se a quantidade de CT por grama de alimento.

3.3.3) DETECÇÃO DA PRESENÇA *SALMONELLA* (ANDREWS *et al.*, 2001)

Na detecção da *Salmonella*, a água peptonada homogeneizada com a amostra foi incubada por 24 horas a 35°C , sendo esse passo chamado de pré-enriquecimento. Após esse período, 0,1 ml foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco) e deixadas na estufa a 42°C por 24 horas. Outra alíquota de 1 ml foi transferida para o caldo Tetracionato, que recebeu 0,1ml de iodo-iodeto imediatamente antes do uso (Difco) e incubado a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, uma alçada de cada tubo foi semeada em ágar SS (Difco) e ágar XLD (Difco). As placas foram incubadas invertidas a 35°C . Após 24 horas, as colônias características de *Salmonella* foram repicadas em tubos de ensaio contendo o ágar Trypticase de Soja (TSA – Difco), sendo consideradas cepas estoque.

Os testes bioquímicos foram realizados a partir das cepas estoque, que foram inoculadas no ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI – Difco) e incubados a 35°C/24 horas. As cepas com leitura positiva para *Salmonella* também foram inoculadas em ágar fenilalanina (Difco). Com adição posterior de uma solução de cloreto férrico. As amostras que não alteraram a coloração do cloreto férrico foram consideradas positivas para *Salmonella* e a confirmação ocorreu através de testes sorológicos.

Nos testes sorológicos, as cepas foram avaliadas quanto à presença dos antígenos somático (O) e flagelar (H). Neste teste, algumas gotas de cada um dos soros polivalentes (Probac do Brasil) foram pingadas sobre lâminas de vidro e um pouco do crescimento foi homogeneizado aos soros. Os soros que aglutinaram confirmaram a presença de *Salmonella* sp no alimento.

3.4) DETECÇÃO DA PRESENÇA DE *SALMONELLA* PELA PCR

3.4.1) EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

A pesquisa de *Samonella* nos alimentos pela PCR foi realizada a partir dos caldos de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato.

Para a extração de DNA, 1 ml de cada um dos caldos foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* (sedimento) foi ressuspenso em 1ml de solução tampão de fosfato (PBS – 0,146M NaCl, 0,01M PO₄²⁻, pH 7,2) e centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Em seguida o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* ressuspenso em 0,2ml de solução de lise (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K). As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por uma hora para ação da proteinase K. Logo após, a temperatura foi elevada para 95°C e mantida por 10 minutos para interromper a ação enzimática. Para finalizar a extração de DNA, as amostras foram novamente centrifugadas (13.000g por 5 minutos). O sobrenadante contendo o DNA extraído foi retirado e armazenado em tubos de microcentrífuga 0,5ml (Axygen) para a realização da PCR.

3.4.2) AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO (PCR)

Para a realização da PCR, preparou-se um “mix” com os seguintes reagentes: 15 µl de água ultra pura autoclavada (Milli-Q Plus - Millipore), 1,25µl

oligonucleotídeo iniciador “sense” (*Primer InvA₁*, 10pmol), 1,25µl oligonucleotídeo iniciador “antisense” (*Primer InvA₂*, 10pmol) (Tabela 2), 1 µl de Taq DNA-polimerase (Biotools), 0,75µl de MgCl₂ (Biotools), 0,25 µl de dNTP Mix (GEHealth Care), 2,5µl de tampão de Reação 10X (Biotools). A este “mix” foi adicionado 3µl da amostra de DNA. Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos, com a substituição da amostra por uma cepa padrão de *Salmonella* (ATCC 13076) e por 3µl de água ultra pura autoclavada (Milli-Q Plus, Millipore), respectivamente.

	Seqüência dos <i>primers</i> (Inv A)	Tamanho do produto amplificado
Inv A ₁	5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC 3'	284pb
Inv A ₂	5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG G 3'	

(Tabela 2) Seqüência dos *primers* InvA e produto da reação.

A amplificação foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) do Laboratório de Diagnóstico Molecular (Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP, Botucatu). A incubação inicial ocorreu a 94°C por 5 minutos, logo após começou a incubação cíclica (35 ciclos) com 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, 60°C durante 30 segundos para anelamento do *primer* e 72°C por 30 segundos para formação da nova fita de DNA (extensão) e uma extensão final de 72°C por 4 minutos.

3.4.3) ELETROFORESE

Os produtos obtidos pela PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 - Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5%. (BioAmerica Inc.) e solução tampão de Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X (TBE – 0,1M Tris, 0,08M Ácido Bórico, 1mM EDTA) por aproximadamente uma hora e meia.

Foi utilizado o SYBR Green I 10X (Invitrogen) adicionado às amostras como revelador, em substituição ao brometo de etídio pelo fato deste ser altamente mutagênico. Antes de ser aplicada no gel de agarose, 8µl da amostra foram misturados a 1µl de SYBR Green I 10X e deixados por 15 minutos sob proteção da luz, os fragmentos de DNA foram comparados com

marcadores de DNA de 100 pares de base (Low Ranger 100bp DNA Ladder – Invitrogen). A visualização dos produtos amplificados foi realizada em fotodocumentador (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

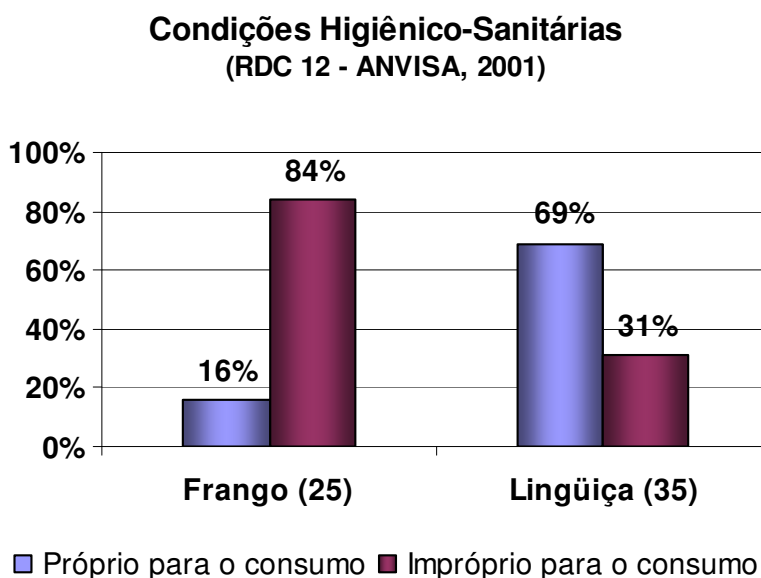
3.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de positividade de *Salmonella* nas amostras de frango e lingüiça utilizando a PCR e a metodologia clássica foram analisadas pelo Teste de Mac Nemar. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

4) RESULTADOS

A determinação do Número mais Provável (NPM) de coliformes termotolerantes indicou que 84% (21) dos 25 cortes de frango e que 31% (11) das 35 amostras de lingüiça estavam fora dos padrões higiênico-sanitários estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que determina um limite máximo de 10^4 de CT por grama carne de aves e 5×10^3 de CT por grama de lingüiça (RDC 12 – ANVISA, 2001). (Figura 3)

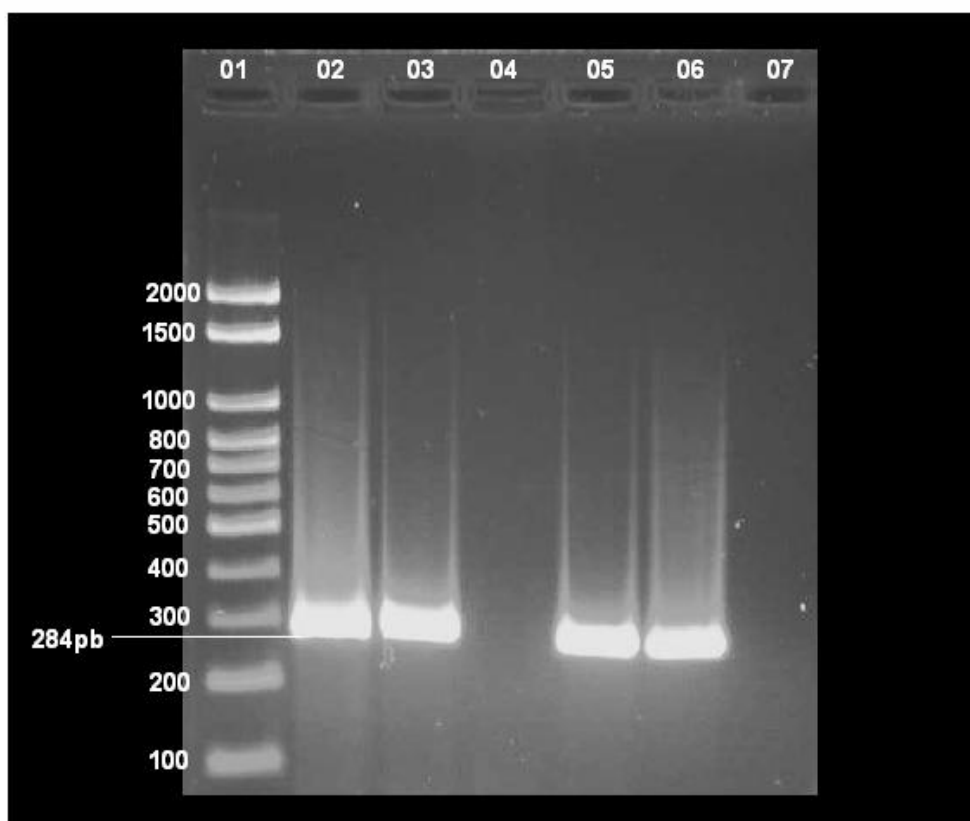


(Figura 3) Condições higiênico-sanitárias das carnes de frango e lingüiças comercializadas em Botucatu-SP.

Em relação à presença de *Salmonella*, entre os 25 cortes de frango analisados foram encontradas duas (8%) amostras positivas pela metodologia tradicional. Esse resultado foi confirmado pela PCR, que detectou mais 14 amostras contaminadas pela *Salmonella*, totalizando 16 (64%) amostras positivas por esta técnica. Diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste utilizado, em que $S=14,0$ e $p=0,0002$. (Tabela 3). A figura 4 apresenta os produtos das reações da PCR.

	PCR positivo	PCR negativo	Total
Método Tradicional positivo	2	0	2
Método Tradicional negativo	14	9	23
Total	16	9	25

(Tabela 3) Número de amostras de frango positivas e negativas pelas metodologias tradicional e PCR. (S=14,0 e p=0,0002).



(Figura 4) Gel representativo dos produtos amplificados. Amostras positivas (284 pb) e amostras negativas. Poço 01: marcador de pares de bases (100pb); poço 02: *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 13076); poços 03,05 e 06: amostras positivas; poço 04: amostra negativa e poço 07: controle negativo.

A comparação entre as metodologias empregadas para a detecção de *Salmonella* entre as 35 amostras de lingüiças também mostrou uma diferença estatística significativa (S=18 e p<0,0001). A PCR confirmou a presença do

patógeno nas quatro (11,43%) amostras que foram positivas pela metodologia clássica e ainda encontrou outras 18 (51,42%) lingüiças contaminadas segundo Tabela 4.

	PCR positivo	PCR negativo	Total
Método Tradicional positivo	4	0	4
Método Tradicional negativo	18	13	31
Total	22	13	35

(Tabela 4) Número de amostras de lingüiça positivas e negativas pelas metodologias tradicional e PCR. (S=18,0 e $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

5) DISCUSSÃO

O uso da técnica do Número Mais Provável (NMP) para a determinação da quantidade de coliformes termotolerantes nos alimentos é estabelecido pela ANVISA. O limite tolerado pela legislação brasileira varia de acordo com o tipo de alimento analisado (ANVISA, 2001). Os produtos que excedem esse limite são considerados impróprios para o consumo, pois os CT são importantes indicadores das condições higiênico-sanitárias dos produtos, demonstrando a contaminação fecal e a possível presença de patógenos (PARDI *et al.*, 1995; SIQUEIRA, 1995).

Os resultados obtidos, no presente estudo, indicaram que uma parcela considerável das lingüiças e carnes de frango comercializados na cidade de Botucatu está fora dos padrões higiênico-sanitários estabelecidos legalmente. Quando os dados encontrados foram comparados com os de outros autores percebe-se que os resultados são superiores aos da literatura. Este trabalho constatou que 84% das amostras de frango analisadas superam o limite de 10^4 de CT/g de alimento e 31% das lingüiças tem NMP de CT acima de 5×10^3 /g. No Brasil, Cardoso *et al.* (2005) analisaram 35 amostras de frango e dessas 26% estavam impróprias para o consumo. Em Porto Alegre (RS), Salvatori *et al.* (2003) ao analisarem 56 amostras de lingüiças frescas comercializadas na região concluíram que apenas 5 (9%) não estavam de acordo com a legislação.

Quanto à presença de *Salmonella*, pela metodologia tradicional, constatou-se que 8% dos cortes de frangos e 4% das amostras de lingüiça estavam contaminados. Na Itália, Ranucci *et al.* (2004), utilizando a metodologia convencional, detectaram o microrganismo em dois (8%) das 25 lingüiças avaliadas. Em 2003, Salvatori *et al.* não encontraram o patógeno em nenhuma das 56 amostras de lingüiças analisadas. Nos Estados Unidos, a análise de 212 amostras de frango indicou que apenas nove (4,2%) continham o patógeno (ZHAO *et al.*, 2001). No Brasil, um estudo realizado com 150 carcaças de frango constatou que 32% das amostras estavam contaminadas pela *Salmonella* (SANTOS *et al.*, 2000).

Quando as metodologias de detecção de *Salmonella* são comparadas nota-se uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de amostras positivas. O presente estudo encontrou uma positividade de 8% (2/25) pela

técnica tradicional e de 64% (16/25) pela PCR para as amostras de frango. Das 35 lingüiças avaliadas, pelo método convencional, apenas quatro (11%) apresentaram o patógeno, porém quando testadas pela nova metodologia 22 (63%) amostras estavam contaminadas.

Esses resultados corroboram os dados presentes na literatura e demonstram a maior sensibilidade da PCR na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos. Em 1997, Chen *et al.* detectaram *Salmonella* em 33 das 50 (66%) carcaças de frango avaliadas pela PCR e 31 (62%) através da cultura. Whyte *et al.* (2002) ao testarem 198 amostras de pele de frango, encontraram, pela metodologia convencional, 32 (16%) amostras contaminadas com *Salmonella* quando foi realizado a PCR esse número subiu para 45 (23%). No Brasil, uma pesquisa realizada com produtos de origem suína mostrou que das 268 amostras, 42 (34%) estavam contaminadas por *Samonella* e quando foram submetidas pela PCR, 52 (42%) continham o patógeno, sendo que 15 amostras positivas pela PCR foram negativas pela metodologia clássica, uma diferença significativa segundo o teste de Mac Nemar ($p=0,0153$). (CASTAGNA *et al.*, 2005).

A origem das amostras (BRYAN & DOYLE, 1995), bem como a forma de contaminação dessas também interferem na comparação dos resultados. São poucos os trabalhos que avaliam a especificidade e sensibilidade da PCR na detecção da *Salmonella* em produtos contaminados naturalmente (OLIVEIRA *et al.*, 2003; SOUMET *et al.*, 1994,1997). Outro fator que pode afetar a comparação dos resultados é a menor viabilidade das bactérias nos produtos contaminados naturalmente devido a maior exposição às condições adversas como altas concentrações de sal, variações de pH e temperatura (Gouws *et al.*, 1998). Estudos realizados com amostras contaminadas naturalmente verificaram que o pré-enriquecimento das amostras é necessário para a obtenção de resultados mais confiáveis, pois a complexa composição dos alimentos pode dificultar o diagnóstico pela PCR e diminuir sua sensibilidade (AABO *et al.*, 1995; BRYAN & DOYLE, 1995). Além disso, as células não-viáveis não são capazes de crescer durante a etapa de pré-enriquecimento, fato que reduz a chance de resultados falso- positivos (UYTTENDAELE *et al.*, 1998). Segundo Soumet *et al.* (1994), para a detecção de pequenas quantidades do patógeno no alimento é preciso um período de pelo menos 10

horas de incubação em meio de cultura de pré-enriquecimento. Gouws *et al.* (1998) concluiu que para amostras naturalmente contaminadas são necessárias 18 horas de incubação em meio de pré-enriquecimento. Nesse estudo as amostras permaneceram por 24 horas em meio de pré-enriquecimento e 24 horas em meios seletivos de enriquecimento, antes da realização da PCR.

O uso de diferentes tipos de *primers* para a detecção de um mesmo patógeno também pode estar relacionado às divergências encontradas na literatura quanto aos resultados obtidos. Stone *et al.* (1994), relatam que o *primer* escolhido deve ligar-se a regiões comuns a maioria das cepas e não apresentar homologia com outros microrganismos. No presente trabalho, para a detecção da *Salmonella* utilizou-se o InvA. Segundo Galan *et al.* (1992), este *primer* liga-se especificamente à região que codifica proteínas relacionadas com a penetração celular, um componente fundamental na patogênese da doença. Além disso, o grupo de genes *inv* (A, B, C, D e E) está presente na maioria das cepas de *Salmonella* e ausente na região correspondente de *E.coli* (Galan *et al.*, 1992).

Apesar da metodologia tradicional ser uma largamente utilizada e um padrão de diagnóstico na maioria dos laboratórios, a PCR tem demonstrado ser uma técnica mais precisa na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos (SANTOS *et al.*, 2001) O presente trabalho confirma duas grandes limitações da metodologia convencional na identificação de patógenos em produtos do gênero alimentício. Primeiro, ela é extremamente trabalhosa e demorada, pois o isolamento e confirmação da presença da bactéria no produto consomem, em média, uma semana (MALLINSON & SNOEYENBOS, 1989; ANDREW *et al.*, 2003; UYTTENDAELE *et al.*, 2003). Além disso, ela apresenta baixa sensibilidade para a detecção de microrganismos em amostras com o nível de contaminação baixo (D'AOUST, 1992).

A rapidez e a alta sensibilidade são as principais vantagens encontradas na utilização da PCR, pois permitem que as autoridades de saúde pública identifiquem de forma rápida e precisa a contaminação de alimentos, reduzindo os impactos econômicos e na área de saúde provocados por um surto de DTA (MALORNY *et al.*, 2001; UYTTENDAELE *et al.*, 2003). Além de ser uma importante ferramenta para a indústria alimentícia, uma vez que esta

metodologia pode ser utilizada na monitorização da produção animal, da fabricação do alimento e do produto final, assegurando ao consumidor a qualidade do produto (SANTOS *et al*, 2001).

CONCLUSÃO

6) CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a qualidade higiênico-sanitária das lingüiças e carnes de frango comercializadas no município de Botucatu estão fora dos padrões aceitáveis pela legislação vigente, oferecendo sério risco à população. Cabe ao governo estabelecer regras rígidas na fiscalização e controle de patógenos nos produtos destinados à alimentação da população.

Em relação à comparação das metodologias empregadas na detecção da *Salmonella*, a PCR mostrou-se mais rápida e sensível na detecção de *Salmonella*, quando comparada aos métodos tradicionais de identificação.

REFERÊNCIAS

7) REFERÊNCIAS

- AABO, S.; ANDERSON, J.K.; OSLEN, J.E. Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.21, p.180-182, 1995.
- APHA (**American Public Health Association**). Washington, 4^a Ed., 2001.
- ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association Washington, 4^a Ed., p.357-380, 2001.
- ANDREWS, W.H., HAMMACK, T.S. (Food and drug Administration), 2003. **Bacteriol. Anal. Manual on-line**. Capítulo 5: *Salmonella*. Disponível em: www.cfan.fda.gov/~ebam/bam-5.html. Acessado em 25/04/2008.
- ANVISA. **Resolução - RDC n°12**, de 02 de Janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> . Acessado em 15/09/2007.
- BAEUMLER, J.A.; HEFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for iroB. **J. Clin. Microbiol.**, p. 1224-1230, 1997.
- BAEUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v.287, p.50-52, 2000.
- BELI E.; DURAKU E.; TELO, A. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albania. **Int. J. Food Microbiol.**, v.71, p.263-266, 2001.
- BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.26, p.437-441, 1998.
- BOYCE, T.G.; SWERDLOW, D.L.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.333 (6), p.364-368, 1995.
- BRYAN, F. L. & DOYLE, M. P. Health Risks and Consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Protect.**, v.58, n.3, p. 326-344, 1995.
- BULTE, M. & JAKOB, P. The use of PCR-generated INVA probe for the detection of *Salmonella* spp. In artificially and naturally contaminated foods. **Int. J. Molec. Microbiol.**, v.26, p.335-344, 1995.
- CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **J. Microbiol. Methods**, v.23, p.89-103, 1995.

- CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* sp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n. 128, p. 144-150, 2005.
- CASTAGNA, S.M.F.; MULLER,M.; MACAGNAN,M.; RODENBUSCH, C.R.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian J. Microbiol.**, v.36, p.373-377, 2005.
- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL). Outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with homemade ice cream – Florida, 1993. **MMWR**, v.43(36), p.669-71,1994
- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL), 2000.
Disponível em: www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html
Acessado em 26/05/08.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Morbidity and Mortality Weekly Report.**, 2001.
Disponível em: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5002a1.htm.
Acessado em 15/11/2007.
- CHEN, S.; YEE, A.; GRIFFITHS, M.; LARKIN,C.; YAMASHIRO, C.T.; BEHARI, R.; PASKO-KOLVA,C.; RAHN, K.; DeGRANDIS, S.A. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. **Int. J. Food Microbiol.**, v.35, p.239-250, 1997.
- COHEN, N.D.; McGRUDER, E.D.; NEIBERG, H.L.; BEHLE, R.W.; WALLIS,D.E.; HARGIS, B.M. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of Genus *Salmonella*. **Poultry Science**, v.73, p.354-357, 1994.
- COSTALUNGA, S. & TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.33, n.4, p.342-346, 2002
- D'AOUST, J.Y. Commercial diagnostic kits for the detection of foodborne *Salmonella*. **Congress Report Salmonella and salmonellosis**. Ploufragan, France, p.9-19, 1992.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos ligados à segurança e qualidade da carcaça de aves. *In: Semana Acadêmica Veterinária*, 8, São Paulo. Anais. São Paulo, p.71-77, 1998.
- DWORKIN, M.S.; SHOEMAKER, P.C.; GOLDOFT, M.J.; KOBAYASHI, J.M. Reactive arthritis an Reiter's Syndrome following an outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella enteritidis*. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1010–1014, 2001.

- ENGETECNO, 2008. Disponível em: www.engetecno.com.br/linguica.htm
Acessado em 17/11/2007.
- FDA (Food and Drug Administration). **Bacteriol. Analytical Manual**, 7^a e 8^a Ed., Arlington, VA: AOAC International.
- FERREIRA, A.J.B.R. & CAMPOS, M.C.B.S. **Manual de defumados – SEBRAE**. (Agronegócios, 3) Recife, PE, p.36, 2000.
- FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**, 1 ed. São Paulo, 1996.
- FRAZIER, N.C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza Acribia, p.512, 1976.
- GALAN, J.E.; GINICHIO, C; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* members of a new protein family. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 4338-4340, 1992.
- GOUWS, P.A.; VISSER, M.; BROZEL, V.S. A Polymerase Chain Reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24h. **J. Food Prot.**, v.31, p.1039-1042, 1998.
- HILL, W.E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, p.123-173, 1996.
- HITCHINS, A.D., HARTMAN, P.A., TODD, E.C.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins**. 3^a Ed. Washington: American Public Health Association, p.325-369, 1996.
- IBRAHIN, A.; LIEKSACK, W.; STACK1EBRANDT,E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specidc for pathogenic strain of *Yersinea enterocolitica* . **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p.1942-1947,1992.
- INMAN, R.D.; JOHNSTON, M.E.A.; HODGE, M.; FALK J., HELEWA, A. Post dysenteric reactive arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.31, p.1377-1383, 1988.
- IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.38, p.193-196, 1996.
- KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae, coliforms, and Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association Washington, 4^a.Ed., p.69-82, 2001.

- LANTZ, P.G.; HAHNHAGERDAL, B.; RADSTROM, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, p.384-389, 1994.
- LINDQVIST, R.; ANDERSSON, Y.; JONG, B.; NORBERG, P. A summary of reported foodborne disease incidents in Sweden, 1992 to 1997. **J. Food Protect.**, v.63, p.315-320, 2000.
- LUCEY, B.; FEURER, C.; GREER, P.; MOLONEY, P.; CRYAN, B.; FANNING, S. Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification Fingerprint (DAF) of thermophilic *Campylobacter spp.* in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, p.727-734, 2000.
- LUIZ, A.F.; MOREIRA, F.C.; CORRÊA, E.F.; FALCÃO, D.P. Monitoring of the dissemination of *Salmonella* in the chicken Frankfurt-sausage production line of a sausage factory in the state of São Paulo. **Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.5, p.477-480, 2004.
- MALLINSON, E.T. & SNOEYENBOS, C.H. **Salmonellosis. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.** 3^a.Ed. Kendall/ Hunt Publishing, Dubuque, IA, p.3-11, 1989.
- MALORNY, B.; HOOFFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR towards an international standard. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69 (1), p.290-296, 2003.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCaig, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, p.607-625, 1999
- MEAD, G.C. Microbiological quality of poultry meat: a review. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.6, n.3, p.135-142, 2004.
- MENG, J. & DOYLE, M.P. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. **Bull. Inst. Pasteur**, v.96, p.151-164, 1998.
- MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P. Virulence genes of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **Int. J. Food Microbiol.**, v.45, p.229-235, 1998.
- MILLER, S.I. & PEGUES, D.A. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. **In Principles and Practice of Infectious Diseases**, Philadelphia: Churchill Livingstone. 2 vols. 5^a Ed, .v.2, p. 2344-2363, 2000.
- MIN. SAÚDE, 2007 (Ministério da Saúde). Disponível em: www.saude.gov.br
Acessado em 08/03/2008.

- MULLIS, K.B.; FALLONA, F.; SCHARF, S.J.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, New York, v.51, p.263-273, 1986.
- NIELSEN, E.M.; ENGBERG J.; MADSEN, M. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle, and swine. **Immunol. Med. Microbiol.**, v.19, p.47-56, 1997.
- OHL, M. E. & MILLER, S.I. *Salmonella* : A Model for Bacterial Pathogenesis. **Ann. Review Med.**, v.52, p. 259-274, 2001.
- OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; Ce', M.C.; ROCHA, S.L.S.; CANAL, C.W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.36, p.217-221, 2003.
- PANISELLO, P.J.; ROONEY, R.; QUANTICK, P.C.; STANWELL-SMITH, R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **Int. J. Food Microbiol.**, v.59, p.221-234, 2000.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: Riscos microbiológicos da carne**, v.1, p.294-308, 1995.
- PENNER, J.L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.1, p.15772, 1998.
- PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; GELLI, D.S.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, p.477-483, 1998.
- PUTTERMAN, C. & RUBINOW, A. Reactive arthritis associated with *Clostridium difficile* pseudomembranous colitis. **Semin. Arthritis Rheum.** v.22, p.420-426, 1993.
- RANUCCI, D.; MIRAGLIA, D.; BRANCIARI, R.; D'OIDIO, V.; SEVERINI, M. Microbiological characteristics of hamburgers and raw pork sausages, and antibiotic-resistance of isolated bacteria. **Vet. Research Communications**, 28, 269-272, 2004.
- SALVATORI, R.U.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.R.I. Microbial safety of sausage collected in the central market of Porto Alegre – RS, Brasil. **Ciê. Rural**, v.33, n.4, p.771-773, 2003.
- SANTOS, D. M. S.; JUNIOR, A. B.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T., AMARAL, L.A. *Samonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesq. Vet. Bras.** v.20, n.1, 2000.

- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P. e LOPES, R.F.F. Identificação de *Samonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 29(2), p.87-92, 2001.
- SCUDERI, G.; FANTASIA, M.; FILETICI, E.; ANASTASIO, M.P. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. **Epidemiol. Infect.**, v.116, p.257-265, 1996.
- SILVA, N. & JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, p.228, 1995.
- SILVA, E.N. Mitos e realidade no controle de *Salmonella* enteritidis em matrizes. *In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*, Campinas, São Paulo, Brasil. p.97-108, 1997.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo, Varela, 2ª.Ed., 1997.
- SILVA, E.N. & DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 4, n.2, p. 85-100, 2002.
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimento**. Brasília: EMBRAPA, p.159, 1995.
- SLAVICK, M.F.; KIM, W.J.; WALKER, J.T. Reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* on chicken carcasses by changing scalding temperature. **J. Food Protection**, v.58, p.689-691, 1995.
- SOCKETT, P.N. The economic implications of *Salmonella* infection. **J. Appl. Bacteriol.** v.71, p.289-295, 1991.
- SONG, J.H.; CHO, H.; PARK, M.Y.; NA, D.S.; MOON, H.B.; PAI, C.H. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with Typhoid fever by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.1439-1443, 1993.
- SOUMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.** v.19, p.294-298, 1994.
- SOUMET, C.; ERNED, G.; SALVAT, G.; COLIN, P. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.24, p.113-116, 1997.
- SPLITTSTOESSER, D.F.; QUEALE, D.T.; BOWERS, J.T.; WILKISON, M. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. **J. of Food Safety**, v.2, p.1-11, 1980.

- STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1742-1749, 1994.
- SVS – M.S, 2007 (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde). **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde.** Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf
Acessado em 08/03/2008.
- TAUNAY, A.T.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES,S.A. The role Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.38, p.119-129, 1996.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES,S.A.; NEVES, B.C.; DIAS,A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 38:315-322, 1996.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F; GONPERTZ, O.F; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 4^a Ed., 2005.
- TRULL, A.K.; EASTMOND, C.J.; PANAYI, G.S.; REID, T.M.S. *Salmonella* reactive arthritis: serum and secretory antibodies in eight patients identified after a large outbreak. **Br. J. Rheumatol.**, v.25, p.13-19, 1986.
- TSAI, Y.L.; PALMER, C.J.; SANGERMANO, L.R. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. **Appl. Env. Microbiol.**, v.57, p.353-357, 1991.
- UBA, 2006. Disponível em : www.uba.org.br
Acessado em 12/10/2007.
- UYTTENDAELE, M.R.; DEBEVERE, J. M.; LIPS, R.M.; NEYTS, K.D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **Int. J. Food Microbiol.**, v.40, p.1-8, 1998.
- UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real time PCR vs. automated ELISA and conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Lett. Appl. Microbiol.** v.37, p.386-391, 2003.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 3^a Ed. Washington: American Public Health Association, p.873, 1996.
- WHYTE, P.; Mc GILL, K.; COLLINS, J.D.; GORLEY, E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Vet. Microbiol.**, v.89, p. 53-60, 2002.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from Greater Washington, D.C., Area. **Appl. Env. Microbiol.** v.67, n.12, p.5431-5436, 2001.

ZOOTEC, 2004. Disponível em: www.upis.br/zootec2004
Acessado em 12/10/2007.