ALESSANDRA GRANGEL MALDONADO

**Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e
miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado
municipal na zona oeste da cidade de São Paulo:
análise crítica entre a técnica convencional em meios de
cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR**

São Paulo

2008

ALESSANDRA GRANGEL MALDONADO

Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1981
FMVZ

Maldonado, Alessandra Grangel

Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR / Alessandra Grangel Maldonado. -- São Paulo: A. G. Maldonado, 2008.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

1. *Salmonella* spp. 2. PCR. 3. Meios de Cultivo. 4. Antibiógrama.
I. Título.

PARECER

Interessado: Alessandra Grangel Maldonado

Assunto: Protocolo de Experimentação adotado em experimento animal.

A Presidência da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e após analisar o projeto protocolado sob o número 1366/2008, intitulado: "Levantamento da ocorrência de *Salmonella spp* em amostras de carcaças e miúdos de frango: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR", no qual foram utilizadas peças de matadouros comerciais, sob responsabilidade da Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 28 de março de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MALDONADO, Alessandra Grangel.

Título: **Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo:** análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: __ / __ / __

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo e paciência

Chico e Dri obrigada por tudo e pela Giovaninha, luz da nossa vida!

Agradeço a prof Dra Simone Balian que além de me orientar, me ajudou com suas palavras sábias que serviram de base para esta caminhada. Além de amiga, acreditou no meu potencial e nunca desistiu...

Ao prof dr. Sílvio Arruda Vasconcelos pela dedicação ao VPS

Obrigada Clarice, seu senso de organização, sua lealdade, sua amizade e o seu incentivo, me serviram de apoio nas horas difíceis (e foram muitas!).

Valéria Filócomo obrigada pela sua amizade, por compartilhar meus momentos de alegria e tristeza por me incentivar em todos meus projetos seu apoio foi muito importante!

Aos técnicos que me acompanharam durante todo meu trabalho me ajudando direta ou indiretamente. Obrigada, Bispo! Nunca vou esquecer sua paciência, sua boa vontade em ajudar, sempre me auxiliando durante as fases mais difíceis do experimento!

Sandra, obrigada pela sua paciência e apoio durante o meu projeto!

Obrigada, Lara pelo seu apoio durante o experimento, seus ensinamentos, sua calma e bom humor me ajudaram muito!

Obrigada, Soninha, pelo seu auxílio na realização do antibiograma, sua amizade e paciência!

A Zenaide do Laboratório de Zoonoses Bacterianas pela sua inestimável ajuda!

Muito Obrigada! Você foi minha “Santa Auxiliadora”!

Amani, Flávia, Gi, Vivi, Mari, Pilar, adoro vocês!

Dr^a Andrea Moreno, muito obrigada pela sua confiança e por ter me permitido fazer parte do seu laboratório eu agradeço!

Dr. Ernesto Hofer do Instituto Oswaldo Cruz pela sua cordialidade, pelos artigos enviados e pelos esclarecimentos

Ao pessoal do Laboratório de Sanidade Suína, obrigada, Tânia, Rê Paixão, Thaís, Sérgio, Débora, Gleise pela paciência e auxílio na PCR,

Tania obrigada pela sua ajuda na extração das amostras!

Patty Pinky obrigada pela suas palavras de apoio e pela sua amizade!

Obrigada Priscila por me permitir usar o seu laboratório e pela sua confiança

Obrigada Sheila, por ter me auxiliado no laboratório de Biologia Molecular!

Obrigada Van Salgado pelo seu auxílio na PCR

Aos secretários da pós-graduação Cristina, Virgínia e Danival pelo carinho e pela amizade

Fátima da biblioteca obrigada pela sua ajuda na finalização da dissertação

Ao pessoal da biblioteca obrigada pela ajuda! Sol, Fernanda, Elza.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado

As secretárias da pós-graduação Joana, Cláudia, Dayse, por todo auxílio prestado durante o mestrado

RESUMO

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo**: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. [Occurrence of *Salmonella* spp in whole broiler carcasses and organ samples obtained at a commercial retail market in the western area of the city of São Paulo: a critical analysis of traditional culture media growth technique and polymerase chain reaction – PCR]. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O presente estudo teve por objetivos estudar a ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal da zona oeste da cidade de São Paulo e fazer uma análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. Foram utilizadas 63 carcaças de frangos e 63 conjuntos de miúdos, obtidos no período de novembro de 2006 a maio de 2007. Pesquisou-se salmonela nas amostras pela técnica convencional em meios de cultivo e pela PCR. Pela técnica convencional identificou-se *Salmonella* em (6/63) das amostras de carcaça e (5/63) das amostras de miúdos e, pela PCR obteve-se (20/63) das amostras de miúdos e (28/63) das amostras de carcaça. As estirpes sorotipificadas como *Salmonella* oriundas das amostras de carcaças foram identificadas, como *S. Senftenberg*; *S. Kentucky*; *S. Enteritidis*; *S. Montevideo*; *S. Infantis*, *S. enterica* subsp *enterica* (0:6.7). *S. Enteritidis*; *S. enterica* subsp *enterica*; *S. Infantis* . As estirpes provenientes das amostras de miúdos foram identificadas como *S. Enteritidis*; *S. enterica* subsp *enterica*; *S. Infantis*. As (18/21) estirpes identificadas como *Salmonella* pelo estudo apresentaram resistência aos antimicrobianos testados. O método convencional é indispensável quando se necessita a obtenção da estirpe para estudos de outras naturezas, para se cumprir a legislação brasileira que se vale de padrões microbiológicos estabelecidos pelos métodos convencionais. A técnica da PCR é válida e útil desde que seja padronizada de acordo com as necessidades e condições de cada laboratório; é bastante útil na implementação de sistema APPCC; no monitoramento de agentes específicos dentro de produções de alimentos; para estudos epidemiológicos da ocorrência, dinâmica de distribuição do agente.

Palavras-chave: *Salmonella* spp. PCR. Meios de Cultivo. Antibiógrama.

ABSTRACT

MALDONADO, A. G. **Occurrence of *Salmonella* spp in whole broiler carcasses and organ samples obtained at a commercial retail market in the western area of the city of São Paulo**: a critical analysis of traditional culture media growth technique and polymerase chain reaction – PCR. [Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR]. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of this study was to evaluate the presence of *Salmonella* spp in whole broiler carcasses and multiple-organ samples collected at a commercial retail point in the western area of the city of São Paulo and to conduct a critical analysis of the traditional culture media growth technique and polymerase chain reaction – PCR. A total of 63 whole broiler carcasses and a 63 multiple-organ samples were collected between November 2006 and May 2007. The conventional technique revealed the presence of *Salmonella* in 6/63 whole carcasses and in 5/63 multiple-organ samples, PCR detected *Salmonella* in 28/63 whole carcasses and in 20/63 multiple-organ samples. The following strains were identified in the whole carcasses *S. Senftenberg*; *S. Kentucky*; *S. Enteritidis*; *S. Montevideo*; *S. Infantis*, *S. enterica* subsp *enterica* (0:6,7). *S. Enteritidis*; *S. enterica* subsp *enterica*; *S. Infantis* were identified in multiple organ samples. The (18/21) *Salmonella* strains identified in this study were resistant to the antimicrobial agents tested in this study. In conclusion, the traditional method is essential for the collection of strains for different study purposes; for the observance of the Brazilian legislation, which is based on microbiological standards that were established using traditional methods. Polymerase chain reacton is a valid and useful technique, as long as it is standardized according to the needs and conditions of each laboratory. Polymerase chain reacton is remarkably useful in the implementation of the APPCC system; in the monitorization of specific agents within the food production chain; and for epidemiological studies that evaluate the occurrence, dynamic and distribution of a specific agent.

Key-words: *Salmonella* spp. PCR. Culture media. Antibigram.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Sequência de primers utilizados para amplificar o <i>invA</i>	38
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Organograma para isolamento de <i>Salmonella</i> a partir dos lavados de carcaça e miúdos.....	32
Figura 2 –	Reação sorológica frente ao soro polivalente anti- <i>Salmonella</i> “O”	35
Figura 3 –	Esquema utilizado para determinação do limite de detecção de técnica da PCR	41

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Porcentagem de bactérias identificadas como *Salmonella* spp pelas provas bioquímicas em carcaças e miúdos de frangos resfriados comercializados em mercado e feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 200745
- Gráfico 2 – Porcentagens de estirpes positivas e negativas frente a reação sorológica para confirmação de *Salmonella* spp isoladas em carcaças e miúdos de frangos resfriados comercializados em mercado e feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 200748
- Gráfico 3 - Porcentagem de amostras positivas na reação sorológica de estirpes isoladas em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em mercado e feira-livre na zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 200748
- Gráfico 4 – Frequência de ocorrência de sorotipos de *Salmonella* spp de acordo com o local de obtenção das amostras (mercado e feira) e tipo (carcaça ou miúdos) obtidas na zona oeste da cidade de São Paulo - nov 2006 – maio 200749
- Gráfico 5 – Número de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos testados - São Paulo, nov. 2006 – maio 200751
- Gráfico 6 – Porcentagem de resultados positivos para *Salmonella* spp, a partir da técnica da PCR, em carcaça e miúdos de frango obtidos em um mercado e uma feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 200753

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reação sorológica frente ao soro polivalente anti- <i>Salmonella</i> “O”	42
Tabela 2 -	Frequência e porcentagem de bactérias identificadas pelas provas bioquímicas em carcaças e miúdos de frango resfriado comercializado em feira-livre e mercado municipal da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 2007	45
Tabela 3 -	Resultado proveniente da reação sorológica frente ao soro polivalente anti- <i>Salmonella</i> “O” (Probac®) em estirpes isoladas em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em um mercado municipal e uma feira-livre na zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007	44
Tabela 4 –	Frequência e porcentagem de estirpes de <i>Salmonella</i> oriundas de amostras de carcaças resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos testados - São Paulo , nov. 2006 – maio 2007	50
Tabela 5 –	Frequência e porcentagem de estirpes de <i>Salmonella</i> oriundas de amostras de miúdos resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos testados - São Paulo , nov. 2006 – maio 2007	51
Tabela 6 –	Porcentagem de resultados positivos para <i>Salmonella</i> spp, a partir da técnica da PCR em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em um mercado e uma feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA = Agencia Nacional de vigilância Sanitária
APPCC = Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC= American Type Culture Collection
BPLS = Verde brilhante vermelho de fenol lactose
DNA = Ácido desoxirribonucléico
DTAs = Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
E.U.A = Estados Unidos da América
FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz
H₂S = sulfeto de hidrogênio
MgCl₂ = Cloreto de magnésio
Tris HCL Tris (hidroxemetil) amino metano com ácido clorídrico
TBE tris borato EDTA
TE tampão Tris-EDTA
PCR = Reação em cadeia pela polimerase
pb = pares de base
pH = potencial hidrogeniônico
primers Oligonucleotídeos
TSI = Ágar ferro três açúcares
WHO = World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C =	graus centígrados
% =	porcentagem
log =	logaritmo na base 10
UFC =	unidade formadora de colônias
<i>g</i> =	gravidade
M =	molar
mg =	miligrama
mL	mililitro
Mm =	milimolar
rpm =	rotações por minuto
V =	volt
μM =	micromolar
mcg =	micrograma
μl =	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	TAXONOMIA	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE	22
2.3	METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i>	24
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	PREPARO DA AMOSTRA PARA PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp	29
4.1.1	Pré Enriquecimento	29
4.2	TÉCNICA CONVENCIONAL EM MEIOS DE CULTIVO PARA A PESQUISA DE <i>Salmonella</i> SPP	30
4.2.1	Enriquecimento Seletivo	30
4.2.2	Isolamento e Seleção	30
4.2.3	Provas Bioquímicas	33
4.2.4	Reação sorológica frente ao anti-soro polivalente “O” (Probac®)	34
4.3	TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR	36
4.3.1	Extração de DNA de colônias bacterianas:	36
4.3.2	Extração de ácido nucléico dos lavados de carcaça	37
4.3.3	Reação de Amplificação do DNA	37
4.3.3.1	<i>Oligonucleotídeos Iniciadores (PRIMERS)</i>	37
4.3.2.2	<i>Amplificação de DNA</i>	39
4.3.2.3	<i>Análise do Produto Amplificado</i>	39
4.4	ANTIBIOGRAMA DAS ESTIRPES DE <i>Salmonella</i> spp	39
4.4.1	Limite de detecção da técnica	40
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	41
5	RESULTADOS	44
5.1	TÉCNICA CONVENCIONAL EM MEIOS DE CULTIVO PARA A PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp	44
5.1.1	Provas bioquímicas	44

5.1.2	Reação sorológica frente ao soro polivalente anti-Salmonella “O” (Probac®)	47
5.1.3	Sorotipificação	48
5.1.4	Antibiograma das estirpes de <i>Salmonella</i> spp	50
5.2	TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR	52
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5.4	Limite de detecção pela técnica PCR	54
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Vários fatores inter-relacionados estabelecem um novo cenário no contexto das doenças veiculadas por alimentos, com desafios e riscos associados à cadeia alimentar. As bactérias de origem entérica estão entre as mais freqüentemente envolvidas com as DTAs (PAYMENT; RILEY, 2002).

Os produtos de origem animal, como carne, leite e ovos, freqüentemente estão envolvidos com DTAs por apresentarem características intrínsecas favoráveis à sobrevivência e multiplicação de microrganismos e por isso contribuem decisivamente para a incidência de infecções geralmente de natureza diarréica (HUONG et al., 2003).

A salmonelose é uma das DTAs mais comum e apresenta distribuição mundial, constituindo um dos maiores ônus frente à saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento e representa um custo significativo para a sociedade (PAYMENT; RILEY, 2002; HUMPREY, 2004; ORJI et al., 2004; WRIGHT et al., 2005; ZAIDI et al., 2006).

Desde a década de 1990, identificaram-se estirpes de *Salmonella* multi-resistentes aos principais antimicrobianos, incluindo os de primeira escolha para o tratamento da salmonelose humana, como as fluorquinolonas e as cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxone), em consequência do uso indiscriminado de antibióticos em animais de açougue (WHO, 2005; WRIGHT et al., 2005; ZAIDI et al., 2006).

Os métodos de cultura microbiológicos são ainda largamente empregados para detecção de salmonelas, mas o controle das infecções depende cada vez mais de um incremento na velocidade e precisão dos testes diagnósticos, principalmente para monitorização da produção animal, na industrialização de alimentos e produto final (FRAVIN et al., 2003;). Várias alternativas têm sido pesquisadas como imunoensaios, imunodifusão, aglutinação em látex, hibridização do DNA. Alguns testes comercialmente disponíveis como ELISA, e os métodos moleculares como a PCR, reduzem o tempo e o trabalho na análise das amostras (BLACKBURN, 1993; BOHAYCHUK et al., 2005).

Com isso, a amplificação de DNA “*in vitro*” através da PCR é mais uma alternativa para detecção de bactérias patogênicas em alimentos (MARLONY et al., 2003).

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento da PCR, o qual permite a amplificação de um fragmento alvo específico de ácido nucléico são importantes para a vigilância epidemiológica que pode se utilizar desta ferramenta analítica para auxiliar na detecção, localização e controle de patógenos causadores de DTAs (GONZÁLES; ROJAS, 2005).

2 REVISÃO DA LITERATURA

AS DTAs em particular as causadas pela *Salmonella* spp representam na atualidade UMA DAS principais preocupações das autoridades sanitárias e isso se deve tanto pelo seu difícil controle na cadeia produtiva como pelo número de pessoas afetadas pelo patógeno.

2.1 TAXONOMIA

Os microrganismos do gênero *Salmonellae* pertencem à família Enterobacteriaceae, são bactérias Gram-negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, oxidase negativa, catalase positiva, apresentam forma de bastonetes, medindo de (0,7-1,5 x 2,0-5µm), geralmente móveis por flagelos peritríquios (exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*); crescem em temperaturas ótimas de 37°C, mas já foram observados crescimentos em temperaturas entre cinco e 45°C, sendo o pH 7 ideal, podendo variar entre quatro e nove. Produzem gás a partir da fermentação da glicose e gás sulfídrico, são capazes de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitratos a nitritos, utilizando citrato como fonte de carbono (JAY, 2000; D'AOUST, 2001).

O gênero *Salmonella* foi objeto de sucessivas modificações quanto a sua nomenclatura e taxonomia, contudo seguem vigentes as proposições desenvolvidas por P.R. Edwards e H.W. Ewing, que na década de 40 definiram e identificaram as primeiras cepas do gênero *Salmonella* e outros membros da família Enterobacteriaceae (POPOFF, 2001).

No início da década de 1970, as espécies do gênero *Salmonella* foram classificadas baseadas em sua epidemiologia, reações bioquímicas e estrutura antigênica, critérios estes, que ainda são utilizados pela grande maioria dos laboratórios (FARMER III, 1999; BRENNER et al., 2000).

Bactérias do gênero *Salmonella* são divididas em duas espécies: *Salmonella*

enterica e *Salmonella bongori* (POPOFF, 2001). *Salmonella enterica* é subdivida em seis subespécies (BRENNER et al., 2000) sendo a subespécie I (subespécie *enterica*) a que apresenta a maioria dos mais de 2.500 sorovares identificados e a que compreende os sorogrupos A a H (POPOFF; BOCKEMÜHL; BRENNER, 2000). Cepas dos sorogrupos A, B, C1, C2, D e E causam aproximadamente 99% das infecções em humanos e animais de sangue quente (POPOFF; LE MINOR, 1997).

Já *Salmonella bongori* e as outras subespécies de *Salmonella enterica* são raramente isoladas de humanos, sendo geralmente isoladas de animais de sangue frio e do ambiente (FARMER et al., 1984). A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis são os sorotipos predominantes em salmonelose humana (FERNANDES et al., 2006). *Salmonella* Typhimurium foi o patógeno mais comum em salmoneloses de origem alimentar no mundo todo até 1991 (TAUXE, 1991). Atualmente, além de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, os sorotipos de salmonelas mais freqüentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar são *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, e *S. Saint Paul* (CHIU et al., 2005; ZAIDI et al., 2006).

Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi descrita recentemente, isolada de sedimento coletado de região aquífera em Oak Ridge, EUA. A sequência de DNA ribossomal mostrou que essa bactéria apresentou maior similaridade (96,4%) com a *Salmonella bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004).

A atualização desse esquema está sob responsabilidade do WHO Centro de referência e pesquisa de *Salmonella*, que é revisado cada cinco anos. Na última revisão do esquema foram descritos 2501 sorotipos (POPOFF, 2005).

A sorotipificação é baseada em um documento denominado Kauffmann-White Scheme que consiste na caracterização, geralmente por testes de aglutinação, utilizando antígenos somáticos (O) e flagelares (H) padrões de fermentação de açúcar e susceptibilidade a bacteriófagos (POPOFF, 2001).

2.2 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE

As salmonelas podem causar um amplo espectro de doenças em humanos variando de febre tifóide, bacteremia, gastrinterite e infecções focais. É uma das

principais causas de gastrinterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (PAYMENT; RILEY, 2002).

A incidência mundial de *Salmonella* não-tifóide tem se elevado desde a década de 1970, entre os sorotipos capazes de infectarem humanos, somente algumas são responsáveis pela maioria dos casos de doença, os sorotipos que se tornaram predominantes na maioria das regiões geográficas são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, possivelmente devido a sua capacidade de invasão, instalação no trato gastrointestinal de animais de açougue e a predileção do agente pelo trato reprodutivo das aves. (HOFER, 1997; HERIKSTAD et al., 2002; BEAL et al., 2004; HUMPHREY, 2004; WEINBERGER; KELLER, 2005).

As salmonelas podem sobreviver a temperaturas de cozimento relativamente baixas no centro de ovos, carnes recheadas ou mal passadas. A falta de boas práticas na manipulação dos alimentos contribui para a disseminação dessas bactérias no ambiente de preparo dos alimentos. *Salmonella* tem a capacidade de aderir a superfícies como teflon, aço, vidro e fórmica, formando biofilmes (AUSTIN, 1998).

A contaminação do alimento também pode ocorrer após o cozimento, através de contaminação cruzada via utensílios de cozinha ou mãos contaminadas. A multiplicação das bactérias pode então ocorrer se o alimento não for refrigerado (KAKU et al., 1995). Segundo Brian e Doyle a ingestão de 10 UFC dessa bactéria podem causar a doença em humanos.

É improvável que a *Salmonella* seja erradicada da cadeia alimentar, mas pesquisas sobre a resposta da bactéria a diferentes condições ambientais podem levar às melhorias nas estratégias de intervenção para os produtores de alimentos e consumidores (HUMPHREY, 2004).

A *Salmonella* não-tifóide é uma das principais causas de doença diarréica em humanos, e um desafio global a saúde pública (HERIKSTAD et al., 2002; WEINBERGER; KELLER, 2005; FERNANDES, 2006; ZAIDI et al., 2006).

A salmonelose extra-intestinal é comumente observada em crianças, paciente imunocomprometidos e idosos. Em pacientes adultos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), as salmonelas mais freqüentemente isoladas são *S. Enteritidis* e a *S. Dublin* (FERNANDEZ et al., 2006).

Sua transmissão para humanos ocorre pela ingestão de carnes, produtos lácteos, ovos e alimentos contaminados (HOFER; SILVA, REIS et al., 1997; BEAL et al., 2004; ORJI, 2004).

Nas granjas a bactéria pode ser introduzida através de rações contaminadas por matérias primas principalmente as de origem animal, como farinhas de carne, ossos, peixe, penas e vísceras (HOFER et al., 1998).

2.3 METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella*

As salmoneloses são reconhecidamente um problema de saúde pública. Diferentes metodologias de diagnóstico estão sendo empregadas e desenvolvidas para identificação rápida e precisa do agente (BOYACHUCK et al., 2005; DICKEL et al., 2005).

O método oficial de diagnóstico para *Salmonella* spp é baseado na metodologia de isolamento e seleção em placas denominadas comumente de microbiológico convencional em meios de cultura (BRASIL, 2003).

O risco de disseminação de microrganismos patogênicos vem crescendo continuamente, controles de qualidade microbiológica são empregados em toda a cadeia de produção alimentar a fim de minimizar o risco de infecção para o consumidor. Neste cenário, o setor de controle de qualidade das empresas é dotado de atribuições e ferramentas capazes de interromper um processo em desacordo com as especificações, ou prevenir eventos graves, como uma infecção ou intoxicação alimentar veiculada por alimentos industrializados. A utilização de métodos de detecção de microrganismos em alimentos é uma das ferramentas utilizadas para garantir a segurança microbiológica dos produtos (MARLONY et al., 2003; DICKEL et al., 2005; FREITAS et al., 2006).

A introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) em diagnósticos microbiológicos tem sido estabelecida em pesquisas laboratoriais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método. Entretanto, existem algumas variáveis a serem consideradas no uso da PCR, como o custo do alto investimento inicial tecnológico, a

necessidade de aprovação oficial e regulamentos e instruções padronizadas (SERPE et al., 1998; FREITAS et al.; 2006).

Objetivos

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da salmonelose na produção de alimentos, foi delineado o presente trabalho que tem por objetivos:

- Verificar as frequências de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango, pelo método convencional em meios de cultivo, obtidas de feira-livre e mercado.
- Verificar as frequências de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango, pelo método da PCR, obtidas de feira-livre e mercado.
- Analisar criticamente a técnica convencional em meios de cultivo e pela PCR.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas para o estudo 63 carcaças de frango e 63 conjuntos de miúdos (pés, moela, fígado e pescoço e cabeça) resfriados correspondentes a cada uma das carcaças. Trinta carcaças e 30 conjuntos de miúdos foram obtidos em uma feira livre na região oeste da cidade de São Paulo; 33 carcaças e 33 conjuntos de miúdos foram obtidos em um mercado e uma feira livre na Zona Oeste da Cidade de São Paulo; no período de novembro de 2006 a maio de 2007.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas até o laboratório de Microbiologia do Setor de Higiene Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por um período máximo de até uma hora. O processamento das amostras ocorreu em até duas horas após a coleta.

Empregou-se a técnica do lavado das carcaças e dos miúdos, de acordo com (SANTOS et al., 2000). A técnica para a pesquisa de *Salmonella* seguiu a Instrução Normativa do MAPA nº 62 / 2003 (BRASIL, 2003).

Como estirpe padrão empregou-se *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, cedida pelo laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP.

4.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA PESQUISA DE *Salmonella* spp

Todas as amostras obtidas foram submetidas a seguinte etapa.

4.1.1 Pré Enriquecimento

Cada amostra foi colocada em um saco estéril para a autoclave contendo 300 mL de solução salina tamponada a 1%, agitada e massageada manualmente durante

60 segundos. Em seguida o conteúdo líquido foi transferido para saco estéril de Stomacher (Nasco®), homogeneizado em velocidade média, também por 60 segundos. Posteriormente foi mantido em temperatura ambiente por uma hora e então incubadas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 20 h.

Após este período, a amostra foi novamente massageada por 60 segundos, evitando ressuspender o material sólido. De cada amostra retirou-se uma alíquota de 15 mL, transferidos para tubos cônicos de polipropileno para a técnica da PCR. O restante do conteúdo foi utilizado na técnica convencional em meios de cultivo.

4.2 TÉCNICA CONVENCIONAL EM MEIOS DE CULTIVO PARA A PESQUISA DE *Salmonella* spp

A pesquisa de *salmonella* spp abrange etapas de pré enriquecimento de enriquecimento seletivo de plaqueamento diferencial, de confirmação preliminar das colônias e a prova sorológica de aglutinação rápida.

4.2.1 Enriquecimento Seletivo

A partir do processo de pré-enriquecimento, a amostra foi semeada em 10 mL dos caldos Rappaport Vassiliadis, Selenito Cistina e Tetracionato. No primeiro foi inoculado 0,1 mL da amostra pré-enriquecida e um nos outros dois caldos; incubados a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho-maria, com agitação contínua, durante 24 horas.

4.2.2 Isolamento e Seleção

Cada um dos caldos foi semeado em estrias, nos meios sólidos Rambach e BPLS, incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa por 24 horas figura 1.

De acordo com a Instrução Normativa do MAPA nº 62 / 2003 (BRASIL, 2003), de cada placa oriunda de cada caldo devem ser selecionadas de três a dez colônias suspeitas de *Salmonella* spp, para os testes bioquímicos.

No ágar Rambach, foram consideradas colônias suspeitas de *Salmonella* spp as que se apresentavam de cor vermelha e no ágar BPLS, as colônias incolores ou rosadas, entre translúcidas e ligeiramente opacas. As colônias suspeitas foram repicadas em ágar estoque e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa por 24 horas, para facilitar o isolamento.

Figura 1- Organograma para isolamento de *Salmonella* a partir dos lavados de carcaça e miúdos

4.2.3 Provas Bioquímicas

Cada colônia suspeita foi submetida às seguintes provas bioquímicas:

- Produção de urease: foi utilizado o caldo uréia esterilizado por filtração (Millipore®), unidade filtradora estéril 0,45 µm e distribuído em volumes de três mL em tubos estéreis. Considerou-se como suspeita os isolados que não produziram uréase (BRASIL, 2003).
- Ágar ferro três açúcares (TSI): semeadura em picada e estriamento na superfície inclinada. Considera-se como suspeitos os isolados que apresentaram as seguintes características no meio, coloração vermelha no bisel em virtude da alcalinização e amarela na base do tubo, pela acidificação do meio, com ou sem produção de gás sulfídrico (formação de bolhas ou deslocamento do ágar com ou sem enegrecimento) (BRASIL, 2003).
- Descarboxilação da lisina: inoculada a amostra em cinco mL do caldo lisina, vedado com vaselina líquida estéril, a maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase, tornando a coloração do meio púrpura (BRASIL, 2003).
- Meio SIM: prova de motilidade, produção de H₂S e a produção de indol. A motilidade positiva caracterizada pela difusão da bactéria pelo meio, a produção de H₂S, verificada pelo enegrecimento do meio, devido à reação deste com o citrato de ferro e amônio, formando um precipitado negro insolúvel e a produção de indol adicionando-se duas gotas de reativo de Kovac's. Considerou-se suspeitos os isolados que apresentaram motilidade positiva, produção de H₂S e sem formação de indol (BRASIL, 2003).
- Prova da Oxidase: foi utilizado o bastão (OXOID®) para a prova, a leitura é realizada após dez segundos. Todas as salmonelas são oxidase negativas (BRASIL, 2003).

A série bioquímica foi incubada a 36 ± 1°C, em estufa por 24 h e somente as colônias consideradas suspeitas para todas as provas bioquímicas acima descritas foram submetidas à reação sorológica.

4.2.4 Reação sorológica frente ao soro polivalente anti-*Salmonella* "O" (Probac®)

Os cultivos provenientes do meio TSI, compatíveis com *Salmonella* spp foram semeados em ágar estoque e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Após incubação, adicionou-se dois mL de solução salina 0,85%, considerada suspensão em teste. Em seguida, em uma placa de Petri colocou-se separadamente, uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O" (PROBAC®), acrescentando-se em cada uma delas uma gota da suspensão em teste. De acordo com o fabricante, PROBAC DO BRASIL, o soro polivalente anti-*Salmonella* contém anticorpos contra os antígenos O dos grupos A, B, C, D e E, contra o antígeno Vi e também contra os antígenos flagelares a; b; c; d; i; 1, 2, 5 (Figura 2).

Com movimentos "em oito", brandos, realizou-se a leitura da lâmina sobre fundo escuro, observando a presença ou ausência de aglutinação em ambas as misturas. Considerou-se como reação positiva quando observou-se ocorrência aglutinação na gota que contém o soro anti-*Salmonella*, reação não específica quando ocorre aglutinação em ambas as gotas (formas rugosas) e negativa quando não há aglutinação conforme ilustrado na figura 2.

As amostras positivas para o gênero *Salmonella* spp foram enviadas à FIOCRUZ-RJ, para sorotipificação

Figura 2 - Reação sorológica frente ao soro polivalente anti- *Salmonella* “O”

A metodologia utilizada pela FIOCRUZ utiliza anti-soros somáticos e flagelares, polivalente e monovalentes, evidenciando-se as reações pela técnica de soro-aglutinação rápida ou em lâmina, no tempo máximo de 60 segundos. Inicialmente, são caracterizados os grupos sorológicos mais incidentes/prevalentes (O:4; O:7; O:8; O:9 e O:3, 10) e no caso da aglutinação em algum anti-soro O, determina-se a estrutura flagelar, tanto na fase 1 (específica) e fase 2 (inespecífica) com antissoros H, de acordo com o esquema de Kauffmann & White. O antígeno vivo, obtido pela suspensão em salina (0,9%) de um cultivo de 18 a 24 horas a 37°C em ágar nutriente inclinado. Sempre com colônias lisas (forma S) (HOFER, 2008).

4.3 TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR

Após o pré enriquecimento, as amostras foram submetidas as seguintes etapas para a realização da PCR.

4.3.1 Extração de DNA de colônias bacterianas

As colônias suspeitas selecionadas e isoladas em ágar estoque foram retiradas com alças bacteriológicas descartáveis e transferidas para três mL de caldo BHI. As amostras foram incubadas entre duas a quatro horas, para extração de DNA. Seguiu-se o protocolo de extração de DNA descrito por Boom et al. (1990).

Foi adicionada 200µL da cultura a um microtubo contendo 1mL do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1mL, Tris-HCL 0,1 M [pH 6,4] 111,2 mL, EDTA 0,5M 8,8 ml) e 40 µL da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 µL e 5 mL água ultrapura). O microtubo foi agitado por 30 segundos e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o foi centrifugado por 90 segundos a 15200 *g*.

O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado adicionou-se 1 mL do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100mL).

O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos a 15200 *g* o sobrenadante foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento.

O pélete obtido por 20 minutos. Após a completa secagem foi adicionado 100µL de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]), agitado durante um minuto e mantido à 56°C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado por cinco minutos a 15200 *g*, os sobrenadantes contendo o DNA foram armazenados nos microtubos e numerados.

As amostras de DNA foram mantidas a -20° C até a realização da PCR. A cada extração realizada utilizou-se como controle positivo uma amostra de

Salmonella Typhimurium ATCC 14028 e dois controles negativos proveniente das etapas.

4.3.2 Extração de ácido nucléico dos lavados de carcaça

Foram utilizados tubos cônicos de polipropileno de 15 mL com 15 mL do conteúdo da etapa do pré-enriquecimento, foram submetidos à centrifugação a 4500 rpm durante cinco minutos, para formação do pélete. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se 1,5 mL de água ultrapura; o conteúdo foi homogeneizado em vórtex, durante 60 s e transferido para microtubos de 1,0 mL com auxílio de micropipetas. Foram então centrifugados a 4500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se um mL de água ultrapura. Essa etapa foi repetida mais uma vez e após a segunda centrifugação, o sobrenadante não foi desprezado, o conteúdo foi homogeneizado. As amostras obtidas até aqui foram mantidas congeladas a -20°C, para posterior extração. As etapas constantes do item 4.3.2 foram introduzidas, a fim de diminuir a quantidade de debris celulares.

Das amostras congeladas utilizou-se 200µL para extração de DNA, segundo procedimento descrito em 4.3.1.

4.3.3 Reação de Amplificação do DNA

Este processo visa reproduzir um determinado trecho de DNA a ser estudado.

4.3.3.1 Oligonucleotídeos Iniciadores (PRIMERS)

O critério de escolha dos *primers* considerou a especificidade para a identificação do gênero *Salmonella* spp. Os *primers InvA*, amplificam um fragmento de 457bp e são específicos para bactérias do gênero *Salmonella* (GALAN et al., 1992; STONE et al., 1994). A sequência dos *primers* está apresentada no quadro 1.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
SAL A	5'-TGC CTA CAA GCA TGA AAT GG- 3'
SAL B	5'-AAA CTG GAC CAC GGT GAC AA- 3'
Quadro - 1 Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificar o <i>invA</i>	

4.3.2.2 Amplificação de DNA

A reação de amplificação foi realizada num volume de 50µL, contendo por amostra individual 25,2 µL água ultrapura; 8,0 µL dNTP; 5,0 µL buffer; 2,5 µL ;SAL A, 2,5 µL SAL B; 1,5 µL MgCL₂; 0,3 µL *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carsbald, Califórnia, USA) e 5,0 µL de DNA extraído

As amostras foram amplificadas em termociclador Master Cycle Gradient (Eppendorf®) nas seguintes condições: aquecimento inicial a 93°C por 5 minutos, 35 ciclos de 93°C por um minuto, 60°C por um minuto e 30 segundos e 72°C por um minuto e trinta segundos e aquecimento final de 72°C por cinco minutos.

4.3.2.3 Análise do Produto Amplificado

A análise do produto amplificado foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8). O gel foi submetido à voltagem constante entre 6 e 7V / cm.

A imersão do gel numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, durante 20 minutos e posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Estas foram comparadas com um padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de base.

4.4 ANTIBIOGRAMA DAS ESTIRPES DE *Salmonella* spp

As cepas de *Salmonella* foram submetidas ao teste de sensibilidade conforme técnica de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), com a utilização de discos impregnados com os seguintes antibióticos: amoxicilina+clavulonato (10mcg), amicacina (30mcg), ampicilina (10mcg), cefalexina (30mcg), cefalotina (30mcg),

cefepime (30mcg), cefoxitina (30mcg), ceftazidima (30mcg), ceftriaxona (30mcg), cefuroxima (30mcg), ciprofloxacino (5mcg), enrofloxacina (15 mcg), gentamicina (10mcg), sulfazotrin (25mcg).

4.4.1 Limite de detecção da técnica

Vários fatores afetam a interpretação e comparação de resultados da PCR entre os laboratórios, como, por exemplo, a concentração de $MgCl_2$, fornecedor e concentração da taq DNA polimerase, variações no lote de iniciadores, métodos de extração de DNA. Acredita-se que cada laboratório deve determinar seus padrões de reação e controles da PCR, estabelecendo critérios para análise de seus resultados (TYLER et al., 1997; SANTOS et al., 2001).

Para a determinação do limite de detecção da técnica da PCR, realizou-se diluições padronizadas a partir da escala 0,5 de MacFarland utilizando-se a cepa Typhimurium ATCC 14028. A partir desta diluição (10^0) foram realizadas oito diluições seriadas de base 10. De cada uma das diluições foram retirados 100 microlitros e semeados, em meio seletivo para *Salmonella* spp (XLT4) e 200 microlitros destinados à técnica da PCR.

A contagem das colônias nos meios seletivos foi realizada após 24h de incubação a 37°C (Figura 3).

Figura 3 – Esquema utilizado para determinação do limite de detecção de técnica da PCR

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As concordâncias observadas e esperadas foram comparadas utilizando-se o indicador kappa (PETRIE; WATSON, 1999) com auxílio do programa SPSS 9.0 para Windows (Tabela 1).

Tabela 1- Relação entre os valores de kappa e os graus de concordância

VALOR DE KAPPA	CONCORDÂNCIA
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1	Perfeita

Resultados

5 RESULTADOS

Para facilitar a compreensão dos resultados, a palavra “amostra” estará sempre se referindo ou a carcaça (C) ou aos miúdos (M).

Ao final do estudo, completou-se 30 amostras de carcaça e 30 de miúdos provenientes de uma feira-livre e 33 amostras de carcaça e 33 de miúdos de um mercado municipal, ambos da zona oeste de São Paulo.

5.1 TÉCNICA CONVENCIONAL EM MEIOS DE CULTIVO PARA A PESQUISA DE *Salmonella* spp

Esta seção aborda os resultados das provas bioquímicas, reação sorológica frente ao soro polivalente anti-*Salmonella* “O” e a sorotipificação.

5.1.1 Provas bioquímicas

De cada amostra de carcaça e miúdos submetidas à pesquisa de *Salmonella* spp, foram examinadas três a dez colônias que geraram um total de 544 estirpes estudadas. Destas, 300 (55,1%) foram provenientes de 53 carcaças (23 da feira e 30 do mercado) e 244 (44,9%) provenientes de 44 amostras de miúdos (13 da feira e 31 do mercado), todas submetidas às provas bioquímicas.

Das 300 estirpes de carcaças, 17 foram identificadas como *Salmonella* spp, provenientes de dez amostras; sendo as amostras 19C e 23C originárias da feira 2/30 (6,7%) e a 33C, 42C, 43C, 46C, 49C, 50C, 51C e 60C do mercado (8/33 = 24,3%). Já das 244 estirpes obtidas de miúdos, 13 foram identificadas como *Salmonella* spp, oriundas de sete amostras, sendo a 24M da feira (1/30 = 3,3%) e a 31M, 32M, 52M, 55M, 60M e 63M do mercado (6/33 = 18,2%) (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 - Frequência e porcentagem de bactérias identificadas pelas provas bioquímicas em carcaças e miúdos de frango resfriado comercializado em feira-livre e mercado municipal da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 2007

		Bactérias		
Procedência	Das amostras	<i>Salmonella</i>	Outras bactérias	Total
		s p p		
Feira Livre	Carcaça	2 (6,7%)	28 (93%)	30 (100%)
	Miúdos	1 (3,3%)	29 (96,7%)	30 (100%)
Mercado	Carcaça	8 (24,2%)	25 (75,8%)	33 (100%)
	Miúdos	6 (18,2%)	27 (81,8%)	33 (100%)
Total		17 (13,5%)	109 (86,5%)	126 (100%)

Gráfico 1 - Porcentagem de bactérias identificadas como *Salmonella* spp pelas provas bioquímicas em carcaças e miúdos de frangos resfriados comercializados em mercado e feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 2007

5.1.2 Reação sorológica frente ao soro polivalente anti-Salmonella “O” (Probac®)

A partir das provas bioquímicas obteve-se 30 estirpes de *Salmonella* spp, sendo 17 delas provenientes de carcaça (duas da feira e 15 do mercado) e 13 do conjunto de miúdos (quatro da feira e nove do mercado). Todas foram submetidas a prova sorológica. Obteve-se 17/30 (56,7%) estirpes positivas, sendo 10/15 (66,7%) (213, 214, 215, 285, 292, 337, 367, 382, 497, 498), provenientes de seis amostras de carcaças 6/33 (18,2%) (33C, 42C, 46C, 49C, 50C e 60C) do mercado. Obteve-se sete estirpes de miúdos, sendo 4/9 (44,4%) (499, 542, 543, 544) provenientes do mercado e três 3/4 (75%) (170, 171, 172) da feira. As estirpes de miúdos isoladas do mercado foram obtidas de duas 2/33 (6,1%) (60M, 63M) amostras e as isoladas da feira foram provenientes de uma 1/30 (3,3%) (24M) amostra tabela 3.

Das estirpes com reação sorológica negativa, duas 2/2 (100%) (142 e 166) foram provenientes de duas 2/30 (6,7%) amostras de carcaças (19C e 23C); uma 1/4 (25%) (173) proveniente de miúdos, de uma 1/30 (3,3%) amostra (24M), todas obtidas na feira. Das dez estirpes restantes, oriundas do mercado, cinco (5/15) (33,3%) (286, 297, 389, 390, 491) foram provenientes de quatro (4/33 = 12,1%) amostras de carcaças (42C, 43C, 51C e 60C) e, cinco (5/9) (55,6 %) de miúdos (199, 211, 406, 414, 446), oriundas de quatro (12,1%) amostras (31M, 32M, 52M e 55M) (Gráficos 2 e 3).

Tabela 3 - Resultado proveniente da reação sorológica frente ao soro polivalente anti-*Salmonella* “O” (Probac®) em estirpes isoladas em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em um mercado municipal e uma feira-livre na zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

Procedência	Estirpes	Reação Sorológica		Total
		Positivo	Negativo	
Mercado	Carcaça	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15
	Miúdos	4 (44,4%)	5 (55,6%)	9
Feira-livre	Carcaça	0	2 (100%)	2
	Miúdos	3 (75%)	1 (25%)	4

Gráfico 2 – Porcentagens de estirpes positivas e negativas frente a reação sorológica para confirmação de *Salmonella* spp isoladas em carcaças e miúdos de frangos resfriados comercializados em mercado e feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov 2006 – maio 2007

Gráfico 3 - Porcentagem de amostras positivas na reação sorológica de estirpes isoladas em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em mercado e feira-livre na zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

5.1.3 Sorotipificação

Das 30 estirpes enviadas para sorotipificação, seis eram provenientes da feira (quatro de miúdos e duas de carcaças) e 24 provenientes do mercado (nove de

miúdos e 15 de carcaças). Destas, 21 foram sorotipificadas como *Salmonella enterica* subsp *enterica* pertencentes a diferentes sorotipos.

As onze (11/15) (213, 214, 215, 285, 286, 292, 337, 367, 382, 497, 498) estirpes provenientes das seis (6/33) (33C, 42C, 46C, 49C, 50C, 60C) carcaças do mercado apresentaram os seguintes sorotipos: três (3/15) *S. Senftenberg*; três (3/15) *S. Kentucky*; duas (2/15) *S. Enteritidis*; uma (1/15) *S. Montevideo*; uma (1/15) *S. Infantis* e uma (1/15) *S. enterica* subsp *enterica* (0: 6,7) (Gráfico 4).

As seis (6/9) (199, 211, 499, 542, 543, 544) estirpes provenientes de quatro (4/33) (31M, 32M 60M 63M) amostras de miúdos de mercado apresentaram os seguintes sorotipos: duas (2/9) *S. Enteritidis*; duas (2/9) *S. enterica* subsp *enterica*; duas (2/9) *S. Infantis*.

As quatro (4/4) (170, 171, 172, 173) estirpes provenientes de uma (1/30) (24M) amostra de miúdos da feira foi sorotipificada como *S. Enteritidis*.

Das amostras 60 e 63, de carcaça e de miúdos, respectivamente, obtidas no mercado isolaram-se os sorotipos *S. enterica* subsp *enterica* O: 67 e *S. Infantis*.

As 13 estirpes não reconhecidas como *Salmonella* spp pela reação sorológica foram identificadas como, *Proteus mirabilis* 142 (19C), 166 (23C); *Salmonella* Enteritidis 173 (24M), 199 (31M), 211 (32M); *Salmonella* Kentucky, 286 (42C); *Pseudomonas* spp 297 (43C), 390 (51C), 406 (52M), 446 (55M); *Pseudomonas putrefaciens* 389 (51C); *Providencia rettgeri* 414 (52M), 491 (60C).

Gráfico 4 – Frequência de ocorrência de sorotipos de *Salmonella* spp de acordo com o local de obtenção das amostras (mercado e feira) e tipo (carcaça ou miúdos) obtidas na zona oeste da cidade de São Paulo - nov 2006 – maio 2007

5.1.4 Antibiograma das estirpes de *Salmonella* spp

Os antibiogramas das dez estirpes oriundas das carcaças, quatro (36,1%) foram resistentes a amoxicilina+ clavulanato de potássio; seis (54,5%), a amicacina; uma (9,1%) a cefoxitina; quatro (36,4%) a cefuroxima e oito (72,1%) a gentamicina (Tabelas 4 e Gráfico 5).

Tabela 4 - Frequência e porcentagem de estirpes de *Salmonella* oriundas de amostras de carcaças resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos testados - São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

Antimicrobiano	Resistente	Intermediário	Sensível
amoxicilina + ácido clavulânico	4 (36,40%)	1 (9,10%)	6 (54,50%)
Amicacina	6 (54,50%)	0 (0,00%)	5 (45,50%)
Ampicilina	0 (0,00%)	1 (9,10%)	10 (90,90%)
Cefalexina	0 (0,00%)	1 (9,10%)	10 (90,90%)
Cefalotina	0 (10,00%)	1 (9,10%)	10 (90,90%)
Cefepime	0 (0,00%)	0 (0,00%)	11 (100,00%)
Cefoxitina	1 (9,10%)	0 (0,00%)	10 (90,90%)
Ceftazidima	0 (0,00%)	0 (0,00%)	11 (100,00%)
Ceftriaxona	0 (0,00%)	3 (27,30%)	8 (72,70%)
Cefuroxima	4 (36,40%)	5 (45,50%)	2 (18,20%)
Ciproflaxacino	0 (0,00%)	2 (18,20%)	9 (81,80%)
Enrofloxacino	0 (0,00%)	2 (18,20%)	9 (81,80%)
Gentamicina	8 (40,00%)	3 (27,30%)	0 (0,00%)
Sulfazotrin	0 (0,00%)	2 (18,20%)	9 (81,80%)

Gráfico 5 – Número de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos testados - São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

Tabela 5 - Frequência e porcentagem de estirpes de *Salmonella* oriundas de amostras de miúdos resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos testados - São Paulo , nov. 2006 – maio 2007

Antimicrobiano	Resistente	Intermediário	Sensível
amoxicilina + ácido clavulânico	6 (60,00)	0 (0,00%)	4 (40,00%)
amicacina	2 (20,00%)	3 (30,00%)	5 (50,00%)
ampicilina	0 (0,00%)	4 (40,00%)	6 (60,00%)
cefalexina	0 (0,00%)	0 (0,00%)	10 (100,90%)
cefalotina	1 (10,00%)	1 (10,00%)	8 (80,00%)
cefepime	0 (0,00%)	0 (0,00%)	10 (100,00%)
cefoxitina	0 (0,00%)	3 (30,00%)	7 (70,00%)
ceftazidima	2 (20,00%)	2 (20,00%)	6 (60,00%)
ceftriaxona	0 (0,00%)	2 (20,00%)	8 (80,00%)
cefuroxima	6 (60,00%)	3 (30,00%)	1 (10,00%)
ciproflaxacino	0 (0,00%)	3 (30,00%)	7 (70,00%)
enrofloxacino	0 (0,00%)	1 (10,00%)	9 (90,00%)
gentamicina	4 (40,00%)	2 (20,00%)	4 (40,00%)
sulfazotrin	0 (0,00%)	0 (0,00%)	8 (80,00%)

Das estirpes provenientes dos miúdos, seis (60%) foram resistentes amoxicilina mais ácido clavulônico, duas (20%) a amicacina, uma (10%) foi resistente para cefalotina, duas (20%) para ceftazidima, seis (60%) para cefuroxima, quatro (40%) para gentamicina, duas (20%) ao sulfazotrin (Tabela 5).

5.2 TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR

Foram positivas quando testadas pela técnica de PCR, 30/63 (47,6%) amostras provenientes de carcaças e 20/63 (31,7%) de miúdos (Tabela 6 e Gráfico 6).

Das amostras obtidas na feira, foram positivas pela técnica da PCR 4/30 (13,3%) das carcaças e 4/30 (13,3%) de miúdos. Nas amostras obtidas no mercado foram positivas 26/33 (78,8%) das carcaças e 16/33 (48,5%) dos miúdos.

Do total de amostras identificadas como *Salmonella* pela sorotipificação (método convencional), foram concordantes com a PCR 4/6 (66,7%) das carcaças e 2/4 (50%) dos miúdos provenientes do mercado e 1/1 (100%) de miúdos provenientes da feira.

Tabela 6 - Porcentagem de resultados positivos para *Salmonella* spp, a partir da técnica da PCR em carcaças e miúdos de frango resfriado obtidos em um mercado e uma feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

	Carcaça	Miúdos	Total
<i>Salmonella</i> spp	30 (47,60%)	20 (31,70%)	50 (39,70%)
Outra	33 (52,40%)	43 (68,30%)	76(60,30%)
Total	63 (100,00%)	63 (100,00%)	126

Gráfico 6 - Porcentagem de resultados positivos para *Salmonella* spp, a partir da técnica da PCR, em carça e miúdos de frango obtidos em um mercado e uma feira-livre da zona oeste da cidade de São Paulo, nov. 2006 – maio 2007

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O índice kappa apresentou o valor 0,13 entre as amostras de carça e 0,045 entre as amostras de miúdos, apontando fraca concordância entre a obtenção de presença de *Salmonella* spp pelo método convencional e pela técnica da PCR.

5.4 Limite de detecção pela técnica PCR

O limiar de detecção da PCR com o primer selecionado *invA* foi realizado pelo método de Boom, Sol e Salimans (1990) utilizando cepas puras de *Salmonella Typhimurium*, apresentou o limiar de detecção de 40 UFC/mL.

6 DISCUSSÃO

O mecanismo de contaminação de carcaças de aves de abate envolve inicialmente a retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele, durante o processo de abate. A carga microbiana das carcaças de frango e de seus derivados é representada por uma microbiota oriunda das aves vivas, isto é, das penas, intestino e fezes e, incorporada durante os processamento (depenagem, evisceração e *chilling*) e manipulação (desossa e cortes) (MORRIS; WELLS; 1970).

Na presente pesquisa seis (9,5%) das 63 amostras de carcaças e cinco (7,9%) das 63 de miúdos analisadas pela técnica convencional não atenderam ao padrão de ausência de *Salmonella* no produto analisado, porém vale considerar que a metodologia empregada neste trabalho não permite julgar as amostras analisadas como próprias ou impróprias, utilizando como referência a RDC 12 (BRASIL, 2001a). Ao mesmo tempo positividade para *Salmonella* spp, por metodologia capaz de isolar e obter estirpes é prova concreta da ocorrência do agente no produto, o que, por princípio o torna impróprio para consumo.

Carvalho e Cortez (2005) relatam a presença deste microrganismo em seis (13,3%) das 45 amostras de carcaças de frango, Silva et al. (2004) relatam a presença deste microrganismo em 13 (19,1%) das 68 amostras analisadas, pesquisadas e Almeida Filho et al. (2003) constatou 18 amostras contaminadas por *Salmonella* das 40 analisadas. Os dados da literatura mostram uma ocorrência endêmica do agente, fato este facilitado pelo sistema de obtenção de carne de aves mundialmente difundido, utilizando escalda e resfriamento em sistemas coletivos. Mudar a realidade de ocorrência de salmonelas em carne de aves exige alterações nos sistemas de abate, impedindo o contato direto entre carcaças.

Além dos ajustes da tecnologia para se elevar a qualidade sanitária, o desenvolvimento de técnicas rápidas, sensíveis e específicas são também necessárias, para a identificação e monitoramento da ocorrência de agentes de importância. A PCR é uma técnica útil nesse sentido, é aplicável nos procedimentos de verificação em planos APPCC e permite a análise de numerosas amostras ao mesmo tempo para investigar a ocorrência de patógenos (GROCI et al., 2003).

Em 02 de janeiro de 2001 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, publicou a Resolução RDC 12, que atribuiu critérios e padrões

microbiológicos para os alimentos estabelecendo a ausência de *Salmonella* spp em 25g. l (BRASIL, 2001a).

A resolução RDC 13 de 02 de janeiro de 2001, estabelece o Regulamento Técnico para Instruções de uso, preparo e conservação na Rotulagem de Carnes de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados determinando a inclusão na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados as instruções de uso preparo e conservação, pois o processo atual não assegura eliminação completa da Salmonela, apresentando risco à saúde se o alimento não for adequadamente conservado e preparado (BRASIL, 2001b). De acordo com Carvalho e Cortez (2005) esses dados demonstram uma preocupação quanto aos critérios higiênicos sanitários adotados nas cadeias produtivas avícolas, principalmente pela relevância deste patógeno na saúde pública.

Porém o estudo mostrou que houve mais positivos para *Salmonella* pela PCR, 30/63 (47,6%) amostras provenientes de carcaças e 20/63 (31,7%) de miúdos. Das amostras obtidas na feira, foram positivas pela técnica da PCR 4/30 (13,3%) das carcaças e 4/30 (13,3%) de miúdos. Nas amostras obtidas no mercado foram positivas 26/33 (78,8%) das carcaças e 16/33 (48,5%) dos miúdos deve-se considerar que este método, apesar de específico e sensível não demonstra viabilidade celular valendo-se para identificação de positivos para a presença de material genético, indicando que o agente está ou esteve presente no substrato, podendo ou não estar viável quando da sua identificação. Pode ser útil para monitoramentos dentro dos sistemas de produção, desde granja até a industrialização dos produtos, quando se tem por objetivo acompanhar a ocorrência do agente, não sendo relevante a sua situação viável ou não.

Em se tratando da metodologia convencional com uso de meios de cultivo, o longo tempo de análise é devido à utilização de três períodos de incubação, para obtenção de colônias típicas, e de testes de confirmação. O pré-enriquecimento das amostras ocorre em meio não seletivo e tem a finalidade de recuperar células lesadas. O enriquecimento em caldos seletivos permite a multiplicação de salmonelas a um nível detectável no plaqueamento e restringe a proliferação de outras bactérias. O plaqueamento em meios seletivos visa o isolamento de colônias suspeitas que são submetidas a confirmação através de testes bioquímicos e sorológicos.

A técnica convencional em meios de cultivo é considerada o padrão ouro (BRASIL, 2003) sendo mais laboriosa do que a técnica da PCR, concordando com Lantz et al. (1994) Através da técnica em meio de cultivo é possível um aproveitamento maior das estirpes para realização de outras etapas de identificação do agente, sorotipificação, realização do antibiograma e a manutenção da cepa concordando com Cheng-Hsun Chiu e Ou (1996).

São necessários, no mínimo, quatro dias para obtenção de um resultado negativo e seis a sete dias para identificação e a confirmação de amostras positivas pela reação sorológica, mas vale ressaltar novamente que comparações devem ser cuidadosas, em virtude de serem metodologias com princípios diferentes e que geram resultados de naturezas diferentes concordando com os resultados obtidos pelo índice kappa, onde houve uma fraca concordância entre as duas técnicas e discordando de Dickel et al. (2005) que em um estudo sobre três técnicas para pesquisa de *Salmonella* houve concordância entre a técnica convencional em meios de cultivo e a PCR .

A PCR necessita conhecimento técnico mais complexo para a sua execução, desde o preparo da amostra, o processamento, a padronização do protocolo, a escolha do método de extração do DNA e do *primer* utilizado. A técnica utilizada neste trabalho leva 48 horas entre a preparação da amostra até o resultado final, desde que já se tenha previamente padronizado o método de extração do DNA e condução de toda a técnica da PCR.

Neste trabalho empregou-se oito meses para padronizar a técnica escolhida, descrita por Boom et al. (1994), levando em consideração a qualidade da amostra analisada (presença de inibidores, lipídeos, sangue), desenvolvimento de habilidades da pesquisadora e ajustes de parâmetros da reação (temperatura dos ciclos, qualidade dos kits utilizados para o mix), o ambiente (limpeza, química e microbiológica) e equipamentos, conforme descrito por Freitas et al. (2006).

Marloni et al. (2003) e Freitas et al. (2006) concordam que a utilização de técnicas de detecção alternativas como a PCR é uma ferramenta que pode ser utilizada na prática de vigilância e monitoramento da qualidade sanitária, em especial microbiológica de alimentos, desde que a técnica seja previamente validada, através de estudos experimentais e que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Das 17 amostras enviadas para sorotipificação 11 foram identificadas como *Salmonella* pertencente a algum sorotipo e destas, (5 das 11 amostras) apresentaram resultados discordantes (negativos) pela PCR. Pode-se interpretar tais achados pelo fato de que a PCR apesar de altamente sensível, de acordo com Malorny et al. (2003) e Hoofar et al. (2004), sofre interferências da qualidade da amostra analisada, como de alimentos, carnes, por conterem substâncias inibidoras para a reação, tais como lipídeos, sais e proteínas, levando ao aparecimento de falsos negativos. O fato das salmonelas não apresentarem um plasmídeo ou fator de virulência comum a todos os sorotipos pode levar ao aparecimento de resultados falsos negativos na pesquisa utilizando a PCR (THROKOV et al., 2003). Além disso, DNA e células de outros organismos (microbiota competitiva) também afetam a sensibilidade e especificidade da PCR.

Por outro lado, na técnica da PCR não necessita de células viáveis e cultiváveis para detecção do agente, fato que poderá, em certas circunstâncias, levar ao aparecimento de um número maior de positivos quando comparado aos resultados obtidos pelo método convencional. Em contrapartida pela alta sensibilidade da PCR, podem ocorrer contaminações mínimas, com material genético do agente no ambiente e utensílios, levando ao aparecimento de resultados falsos positivos. Em comunicação pessoal com o pesquisador John Maurer¹, revela que a contaminação entre as diversas etapas da PCR pode levar ao aparecimento de falsos positivos e que para evitar tais erros, é fundamental para o laboratório subdividir áreas fisicamente, evitando contaminações cruzadas entre as etapas. Quando ocorre a contaminação por *amplicons* do material já amplificado esta contaminação pode ser carregada na manipulação das amostras pelas luvas, pelas vidrarias (microtubos, grades, etc.), pelos instrumentos (pipetas) e até mesmo pelos kits.

Para Tyler et al. (1997) até as diferentes marcas da *taq* polimerase, e a concentração dos componentes do *mix*, variação nos lotes de iniciadores, métodos de extração de DNA e até a *taq* DNA polimerase [que pode ser degradada por proteinases de acordo com Abu-al-Soud e Radstrom (1998)] podem influir nos

¹ John Maurer. Universidade da Geórgia. Disponível em: <jmaurer@vet.uga.edu>. Acesso em: 2 mar. 2007.

resultados. Por isso, além da habilidade para realizar a técnica é necessária a padronização do método, utilização de marcas diferentes de “kits”, comparação de resultados estabelecendo critérios para a confiabilidade na técnica.

Para Gooding et al. (1999) a especificidade de uma PCR depende da fidelidade dos “*primers*” utilizados, por isso, é necessário utilizar seqüências que sejam únicas para o patógeno alvo. No estudo realizado por RAHN et al. (1992), usando um par de oligonucleotídeos do gene *InvA*, detectaram com sucesso 626 estirpes de *Salmonella* spp de 630 testadas, a partir de uma colônia isolada e incorporada direto na PCR, obtendo uma sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%, pois não foram observadas reações positivas em nenhum controle negativo pertencentes a outras 33 enterobactérias testadas concordando que o *primer invA* utilizado no presente estudo apresenta alta especificidade e sensibilidade.

Vários autores concordam que o pré-enriquecimento aumenta a sensibilidade da técnica aumentando o número de células a um nível detectável facilitando a obtenção de resultados verdadeiros positivos (WANG; YEH, 2002; GROCI et al., 2003, MYINT et al., 2006). É possível que os resultados obtidos como positivos para *Salmonella* pela PCR neste estudo tenham sofrido certa influência de se partir dos pré-enriquecimentos. Myint et al. (2006) afirmam que essa etapa utilizada no método convencional aumenta a sensibilidade da PCR.

A caracterização dos sorotipos de *Salmonella* no estado de São Paulo começou em 1950 e tem sido conduzida pelo Instituto Adolfo Lutz. Desde 1993 tem sido observado um aumento na incidência de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos e não humanos, levando-a a ser o sorotipo mais comumente encontrado em surtos alimentares e casos esporádicos de gastroenterites humanas (FERNANDES et al., 2006).

A partir do final dos anos 90, houve mudanças significativas na epidemiologia da salmonelose no Estado de São Paulo, com aumento de surtos humanos causados pelo sorotipo Enteritidis, freqüentemente a partir de ovos crus e/ou mal cozidos. As freqüências deste sorotipo em frangos sugerem que são um importante reservatório concordando com outros autores. (SILVA; DUARTE, 2003; FERNANDES et al., 2006).

Num levantamento feito por Fernandes et al. (2006) durante 1996-2003 dos 3.554 isolados de *Salmonella* spp em casos humanos do estado de São Paulo *S. Enteritidis* foi o sorotipo mais comumente isolado (67,4%), *S. Dublin* foi identificado

em (2,5%) das amostras e o sorotipo Infantis em (2,3%) das amostras No Brasil, a *Salmonella* Infantis tem sido identificada como um agente etiológico de severas gastroenterites em crianças hospitalizadas desde 1994.

Schroeter, Hoog e Helmut (2004), concordam que o problema com a utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana levam ao aparecimento de estirpes resistentes concordando com resultados obtidos (HIDETAKE et al., 2004; WRIGHT et al., 2005).

O antibiograma revelou que quase todas as estirpes apresentaram resistência aos antibióticos testados. O uso de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes no ecossistema de uso. Patógenos humanos e genes de resistência podem passar entre humanos, animais e outros ecossistemas, via contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (KELLEY et al., 1998). Tem sido uma recomendação da Organização Mundial de Saúde o controle e a restrição do uso de antimicrobianos na produção animal (WHO, 2001).

Num estudo conduzido na Alemanha por Schroeter et al. (2004), relata que no período 2000-2003 houve um aumento da resistência as quinolonas em isolados em tanto de frangos vivos como na carne. Este aumento foi acompanhado por uma elevação na concentração mínima inibitória para o ciprofloxacino, sendo um dado preocupante, pois os derivados das quinolonas são usados em tratamento de casos humanos onde há resistência microbiana ao antibiótico. No presente estudo nenhuma das estirpes oriundas tanto das carcaças quanto dos miúdos apresentaram resistência ao ciprofloxacino e ao enrofloxacin, mas tanto as carcaças quanto os miúdos foram resistentes a maioria das cefalosporinas testadas. As estirpes provenientes dos miúdos foram resistentes amoxicilina mais ácido clavulônico, duas (20%) a amicacina, uma (10%) foi resistente para cefalotina, duas (20%) para ceftazidima, seis (60%) para cefuroxima, quatro (40%) para gentamicina, duas (20%) ao sulfazotrin, e das dez estirpes oriundas das carcaças, quatro (36,1%) foram resistentes a amoxicilina; seis (54,5%), a amicacina; uma (9,1%) a cefoxitina; quatro (36,4%) a cefuroxima e oito (72,1%) a gentamicina.

Durante décadas, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram os agentes antimicrobianos recomendados para o tratamento de infecções severas causadas por *Salmonella*. Altas taxas de resistência a esses agentes têm reduzido significativamente a eficácia desses para o tratamento dessas infecções. Conseqüentemente, fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro têm sido

utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por *Salmonella*, mas isolados resistentes às cefalosporinas de amplo espectro foram descritas em 1980 e desde então outros isolados têm sido identificados (BRADFORD et al., 1998).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- Pela técnica convencional identificou-se *Salmonella* em (6/63) das amostras de carcaça e (5/63) das amostras de miúdos, das amostras provenientes do mercado foram identificadas como *Salmonella* (6/33) das carcaças e (4/33) dos miúdos, e das provenientes da feira (1/30) dos miúdos.
- Pela PCR obteve-se (28/63) das amostras de carcaça e (20/63) das amostras de miúdos; das amostras provenientes do mercado foram positivas para a PCR (26/33) das carcaças e (16/33) dos miúdos e das provenientes da feira (4/30) das carcaças e (4/30) dos miúdos.
- O método convencional é indispensável quando se necessita a obtenção da estirpe para estudos de outras naturezas, para se cumprir a legislação brasileira que se vale de padrões microbiológicos estabelecidos pelos métodos convencionais.
- A técnica da PCR é válida e útil desde que seja padronizada de acordo com as necessidades e condições de cada laboratório; é bastante útil na implementação de sistema APPCC; no monitoramento de agentes específicos dentro de produções de alimentos; para estudos epidemiológicos da ocorrência, dinâmica de distribuição do agente.

REFERÊNCIAS

ABU-AL-SOUD, W.; RADSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR inhibiting samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p 3748–3753, 1998.

ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a Multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1734-1738, 2004.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS microbiology Letters**, v.162, p. 295-301, 1998.

BAILEY, J. S.; COSBY, D. E. Detection of salmonella from chicken and chicken products with the automated bax PCR system. **Journal of Food Protection**, v. 66, n.11, p. 2138-2140, 2003.

BAIRD-PARKER, A. C. Foodborne salmonellosis. **Lancet**, v. 336, p.1231-1235, 1990.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEAL, R. K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S. D.; BARROW, P.; SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 151-164, 2004.

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

BOHAYCHUCK, V. M.; GENSLER, G. E.; KING, R. K.; WU, J. T.; MCMULLEN, L. M. Evaluation of Detection Methods for Screening Meat and Poultry Products for the Presence of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2637-2647, 2005.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of acid nucleic .**Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 259-453, 1990.

BRADFORD, P. A.; YANG, Y.; SAHM, D.; GROPE, I.; GARDOVSKA, D.; STORCH, G. CTX--5, a novel cefotaxime-hydrolyzing b-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1980-1984, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visalegis. **Resolução RDC n. 13/2001. Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados e congelados.** 2001a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 5 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visalegis. **Resolução RDC n. 13/2001. Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados e congelados.** 2001b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 5 abr. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para o Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 fev. 2008.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 326- 344, 1995.

CAPITA, R.; ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCIA-FERNANDEZ, M. C. Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 169-173, 2003.

CARVALHO, A. C. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1-5, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2006. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 56, n. 14, p. 336-337, 2007. Disponível em:
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm?s_cid=mm5614a4_e>
. Acesso em: 5 abr. 2008.

CHENG-HSUN CHIU, JONATHAN, T. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2619-2621, 1996.

CHIU, T. H.; CHEN, T. R. H.; WANG, W. Z.; TSEN, H. Y. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p.259-265, 2005.

COHEN, N. D.; NEIBERGS, H. L.; MCGRUDER, E. D.; WHITFORD, H. W.; BEHLE, R. W.; RAY, P. M.; HARGIS, B. M. Genus-specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 368-371, 1993.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESCHI, G. Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, and the Standard

Culture Method for Detecting *Salmonella* in Meat Products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1393-1396, 2004.

DICKEL, E. L. **Utilização da Microbiologia Convencional, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) no Monitoramento de *Salmonella* em Carcaças de Frango para o Controle Higiênico-Sanitário do Processo de Abate**. 2004. 138 P. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2004.

D'AOUST, J. Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 17-40, 1991.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* species. In: FOOD microbiology: fundamentals and frontiers. New Jersey:Hardcover, 2001. p. 129-157.

DICKEL, E. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; VALLE, S. F.; CECATTI, D. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 31, p. 62-67, 2005.

DORAN, J. L.; COLLINSON, S. K.; KAY, C. M.; BANSER, P. A.; BURIAN, J.; MUNRO, C. K.; LEE, S. H.; SOMERS, J. M.; TODD, E. C. D.; KAY, W. W. *fimA* and *tctC* based DNA disgnostics for *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 291-310, 1994.

FARMER, J. J.; MCWHORTER, A. C.; BRENNER, D. J.; MORRIS, G. K. The *Salmonella*-Arizona group of *Enterobacteriaceae*: nomenclature, classification and reporting. **Clinical Microbiology**, v. 6, p. 63-66, 1984.

FARMER III, J. J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 442-458.

FAVRIN, S. J.; JASSIM, S. A.; GRIFFITHS, M. W. Application of a novel Immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella*

enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 63-71, 2003.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; DIAS, A. M. G.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; MELO, L. C. V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p.179-184, 2006

FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, D. P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. **J. Bacteriol.**, v.174, p. 4338-4349, 1992.

GONZÁLEZ, F. T.; ROJAS H. R. A. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. **Salud Pública de México**, v. 47, n. 5, 2005.

GOODING, C. M.; CHOUDARY, P. V. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 341-347, 1999.

HERISKOTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 1-8, 2002.

HIDETAKE, E.; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROK, S.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 266-270, 2004.

HOFER, E. **Metodologia utilizada - FIOCRUZ**. Disponível em: <hofer@uninet.com.br>. Acesso em: 27 mar. 2008.

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

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 21-27, 1998.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Minireview: practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.

HUMPREY, T. *Salmonella*, stress response and food safety. **Nature**, v. 2, p. 504-509, 2004.

HUONG, L. Q.; FRIES, R.; PADUNGTO, P.; HANH, T. T.; KYULE, M. N.; BAUMANN, M. P. O.; ZESSIN, K. H. Prevalence of *Salmonella* in retail chicken meat in Hanoi, Vietnam. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, n. 1, p. 257-261, 2006.

JAY, J. M. Foodborne gastroenteritis caused by salmonella and shigella. In: JAMES M. J.; MARTIN, J. L.; DAVID, A. G. **Modern food microbiology**. 6. ed. Maryland: Springer, 2000.

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; IRINO, K.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, p. 127-131, 1995.

KWANG, J.; LITTLIDKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 46-51, 1996.

LANTZ, P. G.; HÄGERDAL, B. H.; RADSTRÖM, P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. **Trends Food Science Tech.**, v. 5, n. 12, p. 384-389, 1994.

MACHADO, N.; ZAPATA, J. F.; VASCONCELOS, M. E. L.; BARROSO, M. A. Qualidade microbiológica do frango abatido em estabelecimentos de diferentes portes. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 19, n. 1, p. 13-18, 1988.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 241-249, 2003.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MATHEUS, D. F.; RUDGE, A. C.; GOMES, S. M. M. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 111-115, 2003.

MORRIS, G. K.; WELLS, J. G. *Salmonella* contamination in a Poultry-Processing Plant. **Applied Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 795-799, 1970.

MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. 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, p. 599-604, 2006.

ORJI, M. U.; ONUIGBO, H. C.; MABTA, T. I. Isolation of *Salmonella* from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 86-89, 2005.

PAYMENT, P.; RILEY, M. S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call to action. **American Academy of Microbiology**. Washington, DC, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

PETRIE, A.; WATSON, P. **Statiscs for veterinary and animal science**, Oxford, Malden: Blackwell Science, 1999. 243 p

POPOFF, M. Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8. ed. Paris: WHO, 2001. p. 9-12.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F. W. Suplement 1998 to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v. 151, p. 63-65, 2000.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2005. v. 2, p. 764-799.

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

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOLMSTROM, K.; RASMUSSEN, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 37-45, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SERPE, L.; GUARINO, A.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Rivelazione di *Salmonella* spp. Mediante PCR e ibridazione con sonde specifiche valutazione in prodotti carne dei risultati e confronto con il metodo microbiologico=Detection of *Salmonella* spp. in meat products by PCR and specific probe hybridation: A comparative study with the microbiological method. **Industrie Alimentari**, v. 37, n. 374, p. 1141-1143, 1998.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, v.4, n.2, P. 85-100, 2002.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 9-14, 1998.

THOMASEN, B. M.; DODD, D. J.; CHERRY, W. B. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. **Applied Environ. Microbiology**, v. 34, p. 270–273, 1977.

TRKOV, M.; MAJERIKOVA, I.; JERASEK, B.; STEFANOVICOVA, A.; RIJPENS, N.; KUCHTA, T. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 393-399, 1999.

TYLER, K. D.; WANG, G.; TYLER, S. D.; JOHNSON, W. M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification- based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 339-346, 1997.

SANCHEZ, S.; HOFRACREI, A. Animal sources of salmonellosis in humans. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 4, p. 492-497, 2002.

SANTOS, D. M. S.; JUNIOR, A. B.; FERNADES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A.; *Salmonella* em carcaças de frangos congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 39-42, 2000.

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

SCHROETER, A.; HOOG, R.; HELMUTH, H. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. **J. Vet Med.**, v. 51, p. 389-392, 2004.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated

subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2959-2965, 2004.

TAUXE, R. V. *Salmonella*: a postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 356-368, 1991.

ZAIDI, M. B.; MCDERMOTH, P. F.; CRAY-FERDOGA, P.; LEON V.; CANCHE, C.; HUBERT, S. K.; ABBOTT J.; LÉON M.; ZHAO S.; HEADRICK, M.; TOLLEFSON L. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases asymptomatic children and raw retail meats in Yucatan, Mexico. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, p. 21-28, 2006.

WANG, S. J.; YEH, D. B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella enteritidis* in foods and faecal samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 422-427, 2002.

WEINBERGER, M.; KELLER, N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid *Salmonella* and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 513-521, 2005.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistant salmonella**, Genova , 2005 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 18 out. 2007.

WRIGHT, J. G.; TENGELSEN, L. A.; SMITH, K. E.; BENDER, J. B.; FRANK, R. K.; GRENDON, J. H.; DANIEL, H.; THIESSEN, A. M. B.; GILBERTSON, C. J.; SIVAPALASINGAM, S.; BARRETT, T. J.; BESSER, T. E.; HANCOCK, D. D.; ANGULO, F. J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in four animal facilities. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p.1235-1241, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/05-0111.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2008.