UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de
Salmonella sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa-
PCR-tempo real**

Hans Fröder

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2008

Hans Fröder

Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de
Salmonella sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa-PCR-
tempo real

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Teresa Destro

(Orientador/Presidente)

Profa. Dra. Mariza Landgraf
(1º. examinador)

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
(2º. examinador)

Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
(3º. examinador)

Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira
(4º. examinador)

São Paulo, novembro de 2008.

Aos meus pais,

pelo incentivo, apoio, confiança e por me ensinarem que, em uma viagem de
várias milhas, o primeiro passo é o mais importante.

Teresa e Burkhard,

Digam-me algo,
que certamente esquecerei!

Mostram-me algo,
que provavelmente lembrarei!

Deixem-me fazer,
que certamente guardarei!

Hans Fröder

AGRADECIMENTOS

Como doutorando, tive o privilégio de encontrar muitas pessoas que, particularmente, contribuíram com meus estudos e fizeram com que a área - Ciência dos Alimentos - fosse agradável e fascinante. Eu gostaria de agradecer especialmente:

À Profa. Dra. Maria Teresa Destro, por ter dado a oportunidade em trabalhar com Ciência dos Alimentos. Estou muito grato pelo apoio, pelos valiosos ensinamentos e pelos bons exemplos de conduta ética na vida profissional.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade e apoio recebido durante o desenvolvimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao Deutscher Akademischer Austausch Dienst, pela concessão de bolsas de estudos que possibilitaram o desenvolvimento científico.

Ao Dr. Reiner Helmuth, pelo aceite e oportunidade de desenvolvimento da parte experimental da pesquisa no Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR-Berlin) e pela amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Burkhard Malorny, por me inserir na área da Biologia Molecular, pela paciência, pelas interessantes discussões que enalteceram meus ensinamentos, pela oportunidade e todo apoio recebido durante minha estada em Berlin.

À técnica do laboratório, Cornelia Bunge-Croissant, por todos os ensinamentos, pelos conselhos pessoais e orientações ao longo deste tempo. Sinceramente, muito obrigado! Você foi uma “mãe” durante minha passagem pelo BfR.

Ao pessoal do laboratório de *Salmonella* do BfR: Ernst, Francizka, Gabriela, István, Stephan, Dr. Andreas, Dra. Cristina e Dr. Ralf, meus mais sinceros agradecimentos.

Às professoras Dra. Bernadette D.G.M. Franco e Dra. Mariza Landgraf, pelas orientações, apoio, convívio e amizade. Sinceramente, vocês têm amor à pesquisa e à vida acadêmica.

Às amigas Ylanna Burgos e Margarida Vargas, pelo carinho e pelos momentos de convívio.

Ao amigo Juliano Fellini, pela amizade e por dividir grandes experiências vivenciadas em Leipzig e Berlim.

Aos amigos Eb Chiarini e Cristian Balmer por me acolherem em SP.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia da FCF/USP, Lúcia e Kátia, pela amizade e carinho.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

À Secretaria de Pós-Graduação da FCF/USP.

A DEUS, pela vida e saúde que me tem concedido, diariamente!

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus amados pais, Erico e Loni, e à minha irmã Deisi, pela infinita preocupação e apoio. Sem vocês minha vida e todo esse trabalho não teriam sentido. Vocês são, sem dúvida, o alicerce desta conquista.

Meu sincero muito obrigado!

"Ora a fé é o firme fundamento das coisas que se operam e uma
demonstração das que não se vêem"

Hebreus 11,1

SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ANEXOS.....	xix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xx
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Salmonella</i>	2
1.2. Métodos de detecção.....	4
1.2.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	4
1.2.2. PCR-tempo real (PCR-RT).....	5
1.2.3. PCR-transcriptase reversa (RT-PCR).....	14
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. MATERIAL	21
3.1.1. Cepas bacterianas.....	21
3.1.2. Material fecal.....	21
3.1.3. Alimentos-modelo.....	24
3.2. MÉTODOS	25
3.2.1. Preparo do inóculo para contaminação dos suínos.....	25
3.2.2. Avaliação quantitativa e qualitativa de <i>Salmonella</i> em amostras de fezes suínas por método clássico.....	25
3.2.3. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação direta de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando o gene <i>ttr</i>	27
3.2.3.1. Preparo da curva padrão empregando cultura pura de <i>Salmonella</i>	27
3.2.3.1.1. Extração e purificação do DNA de <i>Salmonella</i>	28
3.2.3.1.2. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando o gene <i>ttr</i>	29
3.2.3.1.3. Cálculo da curva padrão obtida para gene <i>ttr</i>	29

3.2.3.2. Extração e purificação do DNA de <i>Salmonella</i> a partir de fezes suínas naturalmente contaminadas.....	30
3.2.3.3. Quantificação por PCR-RT de <i>Salmonella</i> em fezes suínas naturalmente contaminadas.....	31
3.2.3.4. Preparo da curva padrão empregando DNA purificado de <i>Salmonella</i> artificialmente inoculada em fezes suínas.....	32
3.2.3.5. Taxa de recuperação de DNA de <i>Salmonella</i> purificado empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit.....	32
3.2.4. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando <i>tuf</i>	32
3.2.4.1. Desenho dos <i>primers</i> e da sonda.....	32
3.2.4.2. Preparo das células bacterianas.....	33
3.2.4.3. PCR-RT empregando o gene <i>tuf</i>	34
3.2.4.3.1. Avaliação do teste de PCR quanto à exclusividade e à inclusividade empregando <i>tuf</i>	34
3.2.5. Desenvolvimento de um ensaio baseado no gene <i>tuf</i> para a determinação da viabilidade de <i>Salmonella</i> baseada em transcriptase reversa-PCR-tempo real (RT-PCR-RT).....	34
3.2.5.1. Preparo da curva padrão do <i>tuf</i> -RNA.....	34
3.2.5.1.1. Desenho dos <i>primers</i>	34
3.2.5.1.2. Transcrição <i>in vitro</i> do gene <i>tuf</i>	35
3.2.5.1.3. Curva padrão.....	37
3.2.5.2. Avaliação da estabilidade do RNA transcrito <i>in vitro</i>	38
3.3. Avaliação dos métodos de PCR-RT e RT-PCR-RT empregando <i>tuf</i> para quantificação de <i>Salmonella</i>	39
3.3.1. Avaliação em meio de cultura.....	39
3.3.1.1. Preparo da curva padrão de <i>Salmonella</i>	39
3.3.1.2. Inoculação do caldo e coleta de amostras.....	41
3.3.1.3. Quantificação de <i>Salmonella</i> por semeadura em ágar.....	41
3.3.1.4. Quantificação de <i>Salmonella</i> empregando PCR-RT.....	41
3.3.1.5. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT.....	42
3.3.1.6. Cálculo da viabilidade de <i>Salmonella</i>	43
3.3.2. Avaliação em alimento-modelo.....	43
3.3.2.1. Inoculação dos alimentos-modelo – população elevada de	

<i>Salmonella</i>	44
3.3.2.1.1. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT.....	44
3.3.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT.....	44
3.3.2.1.3. Quantificação de <i>Salmonella</i> e da microbiota acompanhante por semeadura em ágar.....	44
3.3.3. Inoculação dos alimentos-modelo – população baixa de <i>Salmonella</i>	46
3.3.3.1. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT.....	46
3.3.3.2. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT.....	46
3.3.3.3. Quantificação de <i>Salmonella</i> e da microbiota acompanhante por semeadura em ágar.....	46
3.3.3.4. Cálculo da viabilidade de <i>Salmonella</i>	46
3.3.4. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Avaliação quantitativa e qualitativa de <i>Salmonella</i> em amostras de fezes suínas pelo método clássico.....	49
4.2. Desenvolvimento do ensaio para quantificação direta de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando o gene <i>ttr</i>	49
4.2.1. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando células íntegras.....	51
4.2.2. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT em fezes suínas naturalmente contaminadas.....	53
4.2.3. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando DNA purificado de <i>Salmonella</i> artificialmente inoculada em fezes suínas.....	59
4.2.3.1. Taxa de recuperação de DNA de <i>Salmonella</i> purificado empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit.....	59
4.3. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando <i>tuf</i>	60
4.3.1. Avaliação da PCR-RT quanto à inclusividade e à exclusividade empregando <i>tuf</i>	61
4.4. Desenvolvimento do ensaio baseado no gene <i>tuf</i> para quantificação de <i>Salmonella</i> sp. por RT-PCR-RT.....	70
4.4.1. Curva padrão de quantificação de DNA de <i>S. Typhimurium</i>	70
4.4.2. Curva padrão do <i>tuf</i> -RNA.....	72

4.4.3. Avaliação da estabilidade do RNA transcrito <i>in vitro</i>	73
4.5. Avaliação dos métodos PCR-RT e RT-PCR-RT para quantificação de <i>Salmonella</i> empregando <i>tuf</i>	76
4.5.1. Avaliação em meio de cultura.....	76
A. Enumeração da população viável por semeadura em ágar.....	76
B. Quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT.....	77
C. Avaliação da viabilidade de <i>Salmonella</i> empregando RT-PCR-RT.....	78
4.5.2. Avaliação da RT-PCR-RT em alimentos-modelo.....	84
A. Avaliação empregando população elevada de <i>Salmonella</i>	84
B. Avaliação empregando população baixa de <i>Salmonella</i>	93
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
7. ANEXOS	118

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática das diferentes fases da PCR-RT.....	7
Figura 2. Representação esquemática de curvas padrão geradas na PCR-RT.....	8
Figura 3. Princípio fluorogênico do corante SYBR® Green.....	9
Figura 4. Princípio fluorogênico do sistema TaqMan®.....	10
Figura 5. Princípio fluorogênico das sondas MGB Eclipse.....	11
Figura 6. Princípio fluorogênico das sondas Molecular beacons.....	12
Figura 7. Princípio fluorogênico das sondas de hibridização.....	13
Figura 8. Etapas do processo da transcrição reversa (RT-PCR).....	15
Figura 9. Organização genética da ilha de patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i>	17
Figura 10. Mapa dos <i>operons</i> contendo <i>tufA</i> e <i>tufB</i> e na localização no cromossomo de <i>S. Typhimurium</i>	17
Figura 11. Protocolo para quantificação de <i>S. Typhimurium</i> em amostras de fezes suínas.....	26
Figura 12. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de <i>Salmonella</i> em meio de cultura.....	40
Figura 13. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de <i>Salmonella</i> em alimento-modelo contendo população elevada de patógeno.....	45
Figura 14. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de <i>Salmonella</i> em alimento-modelo contendo população baixa de patógeno.....	48
Figura 15. Curva padrão de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) obtida por PCR-RT e gene <i>ttr</i> empregando células diretamente (A) e DNA após tratamento com QIAamp® DNA Stool Kit (B).....	52
Figura 16. Curva padrão média obtida nas quatro quantificações independentes de DNA de <i>Salmonella</i> empregando a PCR-RT.....	54

Figura 17.	Quantificação pelo método clássico (UFC/g [log]) e PCR-RT (UFC eq/g [log]) de <i>Salmonella</i> em fezes suínas naturalmente contaminadas.....	57
Figura 18.	Avaliação da exclusividade e inclusividade da PCRT-RT empregando <i>tuf</i> , baseada na emissão de fluorescência (sinais FAM).....	62
Figura 19.	Curva padrão obtida por PCR-RT usando diferentes concentrações de DNA de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) e <i>primers</i> para <i>tuf</i>	71
Figura 20.	Curva padrão obtida por RT-PCR-RT usando diferentes concentrações de RNA de <i>S. Typhimurium</i> BB441 (A) e 51K61 (B).....	74
Figura 21.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) em caldo Luria-Bertani determinada por semeadura em ágar LB, por RT-PCR-RT e PCR-RT empregando como alvo <i>tuf</i>	80
Figura 22.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) em caldo Luria-Bertani determinada por semeadura em ágar LB, por RT-PCR-RT e PCR-RT empregando como alvo <i>tuf</i>	80
Figura 23.	Viabilidade de <i>S. Typhimurium</i> BB441 (A) e 51K61 (B) incubadas em caldo Luria-Bertani empregando o gene <i>tuf</i>	83
Figura 24.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	88
Figura 25.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	88
Figura 26.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	89
Figura 27.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 8 °C e determinadas por RT-	

	PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	89
Figura 28.	Viabilidade obtida para <i>S. Typhimurium</i> (51K61) no modelo ave durante o período de 165 horas após a inoculação.....	90
Figura 29.	Viabilidade obtida para <i>S. Typhimurium</i> (51K61) no modelo suíno durante o período de 165 horas após a inoculação.....	90
Figura 30.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	96
Figura 31.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	96
Figura 32.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	97
Figura 33.	Populações médias de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), PCR-RT (<i>tuf</i>) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).....	97
Figura 34.	Viabilidade obtida para <i>S. Typhimurium</i> (51K61) no modelo ave durante o período de 358 horas após a inoculação.....	98
Figura 35.	Viabilidade obtida para <i>S. Typhimurium</i> (51K61) no modelo suíno durante o período de 358 horas após a inoculação.....	98

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Alguns estudos sobre quantificação de microrganismos baseados em PCR-RT e RT-PCR-RT.....	19
Tabela 2. Cepas de <i>Salmonella</i> usadas nos testes de inclusividade para o método PCR-RT.....	22
Tabela 3. Cepas de enterobactérias usadas para testes de exclusividade para o método PCR-RT.....	23
Tabela 4. Seqüência dos <i>primers</i> e da sonda usados para o ensaio de quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT, conforme descrito por Malorny et al. (2004).....	30
Tabela 5. Seqüência dos <i>primers</i> e da sonda desenhados para detecção e quantificação de <i>Salmonella</i> por PCR-RT empregando <i>tuf</i>	33
Tabela 6. Seqüência de <i>primers</i> usados para a RT-PCR-RT do gene <i>tuf</i> de <i>Salmonella</i>	35
Tabela 7. Localização e seqüência dos <i>primers tuf</i> desenvolvidos para detectar e quantificar <i>Salmonella</i> sp. por RT-PCR-RT.....	36
Tabela 8. População média de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) (UFC/g) obtida em fezes de suínos artificialmente contaminadas.....	50
Tabela 9. Valores médios de UFC eq de <i>Salmonella</i> e C_t médios obtidos para as curvas padrão de fezes naturalmente contaminadas e submetidas ao PCR-RT após tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.....	53
Tabela 10. População média de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) (UFC eq/g) determinado por PCR-RT após purificação do DNA empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit.....	56
Tabela 11. Taxa de recuperação de células de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) artificialmente inoculadas em fezes suínas e submetidas ao tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.....	60
Tabela 12. Valores C_t médios obtidos por PCR-RT para <i>tuf</i> empregando-se diferentes concentrações de DNA de <i>S. Typhimurium</i> (BB441).....	71

Tabela 13.	Valores C_t médios obtidos por RT-PCR-RT para diferentes concentrações de RNA de <i>S. Typhimurium</i> (BB441 e 51K61).....	73
Tabela 14.	Valores C_t médios para diferentes concentrações de <i>tuf</i> -RNA mantido em tampão RSB modificado ou água livre de RNase.....	75
Tabela 15.	Avaliação da influência do diluente na estabilidade de <i>tuf</i> -RNA submetido a sucessivos processos de congelamento-descongelamento.....	76
Tabela 16.	População média de <i>S. Typhimurium</i> (BB441 e 51K61) obtida por semeadura em ágar Luria-Bertani em diferentes tempos de incubação a 37 °C.....	77
Tabela 17.	Valores médios de UFC eq e respectivos C_t de <i>S. Typhimurium</i> determinados por PCR-RT empregando <i>tuf</i>	78
Tabela 18.	Valores médios de UFC eq e respectivos C_t de <i>S. Typhimurium</i> determinados por RT-PCR-RT empregando <i>tuf</i> -RNA.....	79
Tabela 19.	População média de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) inoculada em caldo Luria-Bertani, incubada a 37 °C e determinada por semeadura em ágar LB (UFC/mL), por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da cultura.....	81
Tabela 20.	População média de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) inoculada em caldo Luria-Bertani, incubada a 37 °C e determinada por semeadura em ágar LB (UFC/mL), por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da cultura.....	82
Tabela 21.	População média de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) artificialmente inoculada em alimentos-modelo ave e suíno e incubada em diferentes temperaturas por diferentes intervalos de tempo.....	87
Tabela 22.	Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da população de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) em alimento-modelo ave armazenado a diferentes temperaturas.....	91
Tabela 23.	Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da população de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) em alimento-modelo suíno ave armazenado a diferentes temperaturas.....	92

Tabela 24.	Enumeração de população viável em alimentos-modelo (ave e suíno) coletados em diferentes intervalos de tempo empregando-se ágar PCA e XLD (UFC/mL).....	95
Tabela 25.	Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da população de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) em alimento-modelo ave armazenado a diferentes temperaturas.....	99
Tabela 26.	Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (<i>tuf</i> -RNA), por PCR-RT (<i>tuf</i>) e viabilidade da população de <i>S. Typhimurium</i> (51K61) em alimento-modelo suíno ave armazenado a diferentes temperaturas.....	100

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo I. Comportamento da curva padrão de <i>S. Typhimurium</i> (BB441) obtida nas quantificações (A, B, C e D) por PCR-RT empregando DNA purificado de <i>Salmonella</i> artificialmente inoculada em fezes.....	118
Anexo II. Localização e seqüência do <i>primer forward</i> (tuf-5F) desenvolvido neste estudo para detectar e quantificar <i>Salmonella</i> sp.....	120
Anexo III. Localização e seqüência da sonda <i>tuf</i> -MGB desenvolvida para detectar e quantificar <i>Salmonella</i> sp.....	121
Anexo IV. Localização e seqüência do <i>primer reverse</i> (tuf-6R) desenvolvido para detectar e quantificar <i>Salmonella</i> sp.....	122
Anexo V. Comportamento de <i>S. Typhimurium</i> BB441 (A) e 51K61 (B) obtido por PCR-RT empregando-se os valores médios de UFC eq do DNA com os respectivos C_t médios.....	123
Anexo VI. Comportamento de <i>S. Typhimurium</i> BB441 (A) e 51K61 (B) obtido por RT-PCR-RT empregando-se os valores médios de UFC eq do RNA com os respectivos C_t médios.....	124
Anexo VII. Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população elevada de <i>S. Typhimurium</i> (51K61).....	125
Anexo VIII. Relação entre UFC eq e número de ciclos para alimento-modelo suíno inoculado com população elevada de <i>S. Typhimurium</i> (51K61).....	127
Anexo IX. Relação entre UFC eq e o número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população elevada de <i>S. Typhimurium</i> (51K61).....	129
Anexo XI. Relação entre UFC eq e o número de ciclos (C_t) para alimento-modelo suíno inoculado com população elevada de <i>S. Typhimurium</i> (51K61).....	131

LISTA DE ABREVIACES

AE	eficiência de amplificao
C _t	<i>threshold cycle</i> (ciclo de deteco)
cDNA	DNA complementar
DNA	cido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NMP	número mais provável
PCR	reao em cadeia de polimerase
PCR-RT	PCR-tempo real
RNA	cido ribonucléico
RT-PCR	PCR-transcriptase reversa
RT-PCR-RT	transcriptase reversa-PCR-tempo real
UFC	unidade formadora de colônia
UFC eq	unidade formadora de colônia equivalente
VNC	viável não-cultivável

FRÖDER, H. **Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de *Salmonella* sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa-PCR-tempo real**. 2008. 155p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RESUMO

Para obter resultados rápidos e confiáveis que permitam o monitoramento da segurança microbiológica de alimentos, seja pela indústria ou pelos órgãos de fiscalização, diversos métodos alternativos têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de *Salmonella*. Os propósitos do estudo foram avaliar a viabilidade de emprego do QIAamp® DNA Stool Mini Kit para extração e purificação de DNA de *Salmonella*; validar ensaios baseados em PCR-tempo real (PCR-RT) para quantificar o DNA de *Salmonella* empregando *ttr* ou *tuf* e desenvolver um ensaio para quantificar *Salmonella* baseado na transcriptase reversa-PCR-tempo real (RT-PCR-RT). Para avaliação do QIAamp® DNA Stool Mini Kit empregaram-se fezes coletadas diretamente do reto de animais infectados ou não, sendo estas últimas artificialmente contaminadas e submetidas à extração segundo protocolo do fabricante. As amostras de DNA isoladas foram quantificadas empregando um ensaio *Salmonella*-específico PCR-RT utilizando como alvo o locus *ttr*. O mesmo ensaio foi utilizado para células de *Salmonella* provenientes de meio de cultura. O ensaio PCR-RT baseado no alvo *tuf* foi validado empregando-se primeiramente cepas de diferentes sorotipos de *Salmonella* e de outras Enterobacteriaceae. A seguir sua eficiência foi avaliada para alimentos-modelo (ave e suíno) artificialmente contaminadas com elevada ($\approx 6 \log \text{ UFC/mL}$) e baixa ($\approx 2 \log \text{ UFC/mL}$) população de *Salmonella* Typhimurium DT 104. A validação do método quantitativo de *Salmonella* por RT-PCR-RT foi realizada primeiramente com células em meio de cultura e posteriormente nos mesmos alimentos-modelo utilizados para PCR-RT. Em ambos os métodos, alíquotas dos alimentos-modelo foram mantidas a 20 °C e a 8 °C, sendo examinadas em diferentes tempos pós-inoculação. Como controle empregou-se a enumeração de microrganismos mesófilos totais e de *Salmonella* por técnicas convencionais. A taxa de recuperação de *Salmonella* em fezes suínas

artificialmente inoculadas, após tratamento com QIAamp[®] DNA Stool Kit, variou entre 25% a 50%, dependendo da quantidade inicial de células. Empregando o DNA extraído e submetendo-o à PCR-RT para o *ttr* obteve-se limite de detecção de 2,8 log UFC eq/g de fezes; método que foi menos sensível que o convencional. A quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando *tuf* apresentou limite de detecção menor que 1 log UFC eq. Os resultados obtidos com este método, empregando-se células em meio de cultura ou alimentos-modelo, foram, de maneira geral, ligeiramente inferiores aos do método convencional. A eficiência de amplificação para PCR-RT e *tuf* foi de 94%. O método RT-PCR-RT apresentou limite de detecção semelhante ao obtido com o *ttr* (2 log UFC eq) e sua eficiência de amplificação foi de 100%. Observou-se que *tuf* é expresso na fase logarítmica de multiplicação bacteriana, o que o torna um bom indicador da viabilidade de *Salmonella*.

Palavras-chave: *Salmonella* sp., quantificação, PCR-tempo real, transcriptase reversa-PCR-tempo real, fezes suínas, *ttr*, *tuf*

FRÖDER, H. **Development of methods for the direct quantification of *Salmonella* sp. using real time-PCR and reverse transcriptase-PCR-real time.** 2008. 155p. PhD Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2008.

ABSTRACT

In order to get fast and trustworthy results that allow monitoring the microbiological food safety either by industries or governmental agencies, diverse alternative methods have been developed for *Salmonella* detection and quantification. The purposes of this study were to evaluate the viability of the use of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for *Salmonella* DNA extraction and purification; to validate assays based on real time-PCR (PCR-RT) to quantify *Salmonella* DNA by using *ttr* or *tuf*, and to develop an assay to quantify *Salmonella* based on reverse transcriptase-PCR-real time (RT-PCR-RT). For QIAamp® DNA Stool Mini Kit evaluation feces taken directly from the rectum of infected or health animals were used, with the former being artificially contaminated. Samples were submitted to DNA extraction, according to manufacturer's protocol. The isolated DNA were quantified using a *Salmonella*-specific PCR-RT targeting the *ttr* locus. The same assay was used for *Salmonella* cells originated from culture medium. The PCR-RT assay with *tuf* as target was first validated employing different *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae strains. After, its efficiency was evaluated on food-models (chicken and swine) spiked with high ($\approx 6 \log \text{CFU/mL}$) and low ($\approx 2 \log \text{CFU/mL}$) *Salmonella* Typhimurium DT 104 populations. The validation of the quantitative RT-PCR-RT method was first conducted with cells grown in culture medium, and then in the same food-model used for PCR-RT. For both methods aliquots of food-models were maintained at 20 °C and 8 °C being evaluated at different incubation times. Enumeration of total mesophilic microorganisms and *Salmonella* based on conventional methods were used as controls. The DNA recovery rate in swine feces artificially inoculated, after QIAamp® DNA Stool Mini Kit treatment, was between 25% to 50% depending the initial amount of cells. Using the extracted DNA and submitting it to PCR-RT for *ttr* a detection level of 2,8 CFU eq/g of feces was obtained. This method showed lower sensitivity than the conventional.

Salmonella quantification by PCR-RT employing *tuf* showed a detection level lower than 1 log CFU eq. The results obtained with this method and cells suspended in culture medium or in food-model systems were, in general slightly lower than those obtained with the conventional method. The efficiency of amplification for PCR-RT *tuf* was 94%. Detection limit of RT-PCR-RT was similar to that of *ttr* (2 log CFU eq) and efficiency of amplification was 100%. *tuf* was expressed in logarithmic phase of bacteria growth curve showing that it is a good viability indicator for *Salmonella*.

Key words: *Salmonella* sp., quantification, real time-PCR (PCR-RT), reverse transcriptase-PCR-real time (RT-PCR-RT), pig feces, *ttr*, *tuf*.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, constatou-se que cerca de 75% das novas doenças que afetaram humanos foram causadas por patógenos oriundos de animais ou de produtos de origem animal (WHO, 2008). Muitas destas doenças têm o potencial de disseminar-se rapidamente a grandes distâncias e tornar-se um problema global. As enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) constituem-se uma preocupação para a área da saúde pública. Em países desenvolvidos, que possuem bom sistema de vigilância epidemiológica, tem-se observado aumento significativo na incidência das mesmas (MMRW, 2004, 2008). Estima-se que nos Estados Unidos, anualmente, 76 milhões de pessoas sejam afetadas por ETA, sendo que 5.000 vão a óbito (MMWR, 2000; Jones et al., 2004). Dentre esses 76 milhões, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose são reportados naquele país e, considerando que os casos menos agudos não são diagnosticados ou relatados, esse número deve ser 30 ou mais vezes maior (CDC, 2008).

Na América Latina, entre 1995 e 2001, foram relatados 5.300 surtos de ETA, 175 mil casos e 274 mortes. 38,1% dos surtos ocorreram no Brasil, 24,8% no Chile, 11,1% na Argentina, 8,% no Peru, 8,2% no Uruguai, 6,3% no Paraguai e 3,2% no Equador. Porém, a avaliação destes dados deve ser criteriosa, pois os levantamentos epidemiológicos podem ser precários em alguns países, não refletindo a realidade (Franco et al., 2003). No Brasil, dos 3.737 surtos ocorridos entre 1999 a 2004, 80% (2.989) foram encerrados sem dados sobre o agente etiológico, 8,4% pelo critério clínico-epidemiológico e somente 15,5% (581) pelo critério laboratorial clínico e/ou bromatológico. Destes, 34,7% (302) foram causados por *Salmonella* spp., seguida por *Staphylococcus aureus* (11,7%) e outros agentes (SVS, 2005). Em São Paulo, de acordo com dados notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde, no período de 2006 a 2007, 1.229 casos de *Salmonella* e cinco óbitos foram constatados, sendo a maionese uma das principais fontes de transmissão (CVE, 2008).

As notificações de ETA estão aquém da realidade, uma vez que a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar é sub-relatada, tanto em nosso país como em outros países em desenvolvimento. Há grande número de bactérias responsáveis por infecções entéricas graves, e que têm os alimentos

como veículo, mas *Salmonella* spp. continua sendo um dos principais agentes etiológicos dessas enfermidades (MMWR, 2007).

A produção industrial de animais e de alimentos de origem animal e o intercâmbio comercial intenso de animais e produtos derivados para o consumo humano têm favorecido a introdução e a disseminação de *Salmonella* e de outros patógenos na cadeia alimentar (Brenner, 1984; WHO, 2007).

A preocupação crescente por parte das autoridades de saúde pública, das empresas produtoras de alimentos e também dos consumidores com as ETA tem levado à implementação de novos sistemas de controle microbiológico em diferentes países. Estes sistemas visam abranger toda a cadeia produtiva, minimizando, significativamente, os riscos para o consumidor final (Wolffs et al., 2006). Para que o controle microbiológico efetivo seja realizado, métodos de análise de alimentos, que sejam eficientes, são necessários.

A International Organization for Standardization (ISO) tem incentivado o desenvolvimento de métodos sensíveis e precisos para a detecção de patógenos que possam estar presente (em número baixo) nas amostras de alimentos, em fezes de animais ou no ambiente (Malorny e Hoorfar, 2005). Dentre estes patógenos, destacam-se as salmonelas.

1.1. *Salmonella*

Salmonella é um bastonete Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, anaeróbio facultativo, não-esporulado, que produz ácido e, algumas vezes, gás a partir de glicose. Geralmente, são produtores de catalase, mas não de oxidase (Le Minor, 1984; ICMSF, 2002).

A classificação e a nomenclatura da *Salmonella* são complexas e, nos últimos anos, sofreram inúmeras modificações (Popoff e Le Minor, 1997). Atualmente, a classificação está baseada em estudos moleculares e divide o gênero em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira espécie é subdividida em seis subespécies, identificadas por algarismos romanos: *S. enterica* subespécie *enterica* (I); *S. enterica* subespécie *salamae* (II); *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa); *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb); *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV); e *S. enterica* subespécie *indica* (VI). Cada subespécie é dividida em sorovares baseados no perfil antigênico que inclui os antígenos

somático “O”, flagelar “H” e capsular “Vi” (ICMSF, 2002; Popoff e Le Minor, 2005). Em 1989, houve a elevação da subespécie *bongori* à categoria de espécie. Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi recentemente descrita e isolada de sedimento coletado em região aquífera. A seqüência de DNA ribossomal mostrou que a bactéria possui similaridade de 96,4% com *S. bongori* (Shelobolina et al., 2004).

Uma boa identificação de sorovares pertencentes ao gênero *Salmonella*, e que vem tendo êxito desde 1934, é o esquema de Kaufmann-White. Na sua publicação, 44 espécies de *Salmonella* foram identificadas e, atualmente, o esquema, que se baseia na presença dos diferentes antígenos, já permitiu a identificação de mais de 2.500 sorovares (Ward, 2006).

Humanos, animais, alimentos e fontes ambientais são potenciais reservatórios de *Salmonella*. O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de humanos e de outros animais de sangue quente ou não. Os sorovares de *Salmonella* podem ser específicos para um único hospedeiro, podem ser ubíquos ou ter um hospedeiro desconhecido (Wolffs et al., 2004). No ambiente, as principais fontes do patógeno são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias e cozinhas. A bactéria pode sobreviver algumas semanas na água e vários anos no solo se a temperatura, a umidade e o pH forem favoráveis (Tietjen e Fung, 1995).

A *Salmonella* geralmente é veiculada pelo consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne de aves, suína e bovina, os ovos e o leite (WHO, 2008). Nos dois primeiros casos, a contaminação usualmente ocorre durante o abate (CDC, 2006). Produtos de origem vegetal também têm sido implicados na transmissão de salmonelose e sua contaminação pode ocorrer na produção primária, com o emprego de esterco contaminado como adubo ou no processamento industrial (CDC, 2006). É fato que a bactéria atinge toda a cadeia de produção de alimentos, desde a matéria-prima até os produtos processados (CDC, 2005; FDA/CFSAN, 2005; WHO, 2005).

1.2. Métodos de detecção

Os métodos tradicionais para a pesquisa de *Salmonella* em alimento ou no ambiente são demorados e trabalhosos (Andrews et al., 2001). Eles envolvem

etapas de enriquecimento não seletivo, seguidas de enriquecimento seletivo e do isolamento em meios sólidos, o que leva de 4 a 6 dias.

Apesar de permitir a recuperação de células de *Salmonella* que possam estar injuriadas, e minimizar a interferência da microbiota acompanhante, estes métodos só permitem a enumeração do patógeno através do emprego da técnica dos tubos múltiplos (Kornacki e Johnson, 2001). Esta técnica é ainda mais trabalhosa e cara que o método de detecção, podendo, inclusive, não apresentar a sensibilidade necessária. Com o objetivo de se obter resultados rápidos e confiáveis que permitam o monitoramento da segurança microbiológica de alimentos, seja pela indústria ou pelos órgãos de fiscalização, diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de *Salmonella*.

Ensaio rápido que usam técnicas imunoquímicas, hibridização e amplificação de ácido nucléico podem oferecer maior sensibilidade e especificidade do que os métodos baseados em cultura, além de permitirem a redução do tempo para obtenção destes resultados. Muitos métodos alternativos atingiram elevado nível de automação, facilitando sua aplicação na detecção rotineira de microrganismos (Norton, 2002).

Na escolha de um método rápido, alguns fatores, como capacidade de detectar baixos níveis do microrganismo alvo, custo, rapidez, possibilidade de automação e aceitabilidade internacional do método, devem ser levados em consideração (van der Zee et al., 2000). Dentre os métodos que podem atender às exigências anteriores, têm-se aqueles que empregam a tecnologia da amplificação do DNA bacteriano.

1.2.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Conceitualizada por Kary Mullis em 1985, a PCR é um processo enzimático, *in vitro*, para amplificação de uma seqüência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Farber, 1996). A PCR de primeira geração, como desenvolvida por Mullis, está baseada no emprego de dois *primers* específicos (pequenos fragmentos de DNA fita simples, com orientações opostas) que flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia da região do DNA delimitada por eles (Farber, 1996).

A reação envolve ciclos de temperatura e é dividida em três etapas: (i) desnaturação do DNA molde em uma fita-simples, (ii) anelamento ou hibridização dos *primers* às regiões complementares no DNA molde e (iii) extensão e síntese do fragmento de DNA. Este ciclo é repetido por 20-40 vezes, sendo que cada novo fragmento sintetizado serve como molde nos ciclos subseqüentes, resultando em aumento exponencial do número de cópias da região do DNA alvo (Farber, 1996). A principal vantagem da aplicação de métodos baseados na amplificação de DNA é a estabilidade destas seqüências que não são afetadas por condições ambientais ou de cultivo.

No método da PCR convencional, uma alíquota do produto amplificado é aplicada em gel de agarose, submetida à eletroforese, corada com brometo de etídio e visualizada sob luz ultravioleta. A comparação, entre as amostras, da presença de bandas de mesmo peso molecular e a sua intensidade determinam um resultado qualitativo sobre a presença do alvo amplificado (Orlando et al., 1998).

1.2.2. PCR-tempo real (PCR-RT)

A segunda geração de métodos que empregam a PCR, denominada PCR-tempo real (PCR-RT), vem ganhando aprovação para detecção de patógenos, inclusive os de origem alimentar. Estes métodos combinam as etapas de amplificação e detecção em uma única reação em tubo fechado, o que minimiza o risco de contaminação da amostra. A principal diferença entre a PCR de primeira geração e a PCR-RT é que, nesta última, é possível detectar o aumento do número de cópias do DNA alvo à medida que a reação é realizada. Isto ocorre porque componentes fluorescentes estão presentes no meio de reação e a intensidade da resposta é diretamente proporcional à amplificação do DNA alvo (Lie e Petropoulos, 1998; Wong e Medrano, 2005). Desta maneira, como o próprio nome sugere, a PCR-RT é uma técnica usada para monitorar o progresso da reação de PCR em tempo real.

Estas características vão ao encontro de muitos critérios importantes de diagnóstico, como rapidez, automação e risco mínimo de contaminação. Além disso, PCR-RT apresenta potencial para ser usada na quantificação do DNA (Heid et al., 1996; Malorny et al., 2003b, c).

Segundo Wong e Medrano (2005), a curva obtida na PCR-RT (Figura 1) pode ser dividida em quatro fases: a) linear, b) exponencial inicial, c) logarítmica-linear e d) platô. A fase linear corresponde aos primeiros 10 a 15 ciclos, nos quais a fluorescência emitida não é suficiente para atingir o limiar de detecção (*threshold line*). Quando a emissão supera o limiar de detecção, inicia-se a fase exponencial inicial e então fica estabelecido o ciclo de detecção (*cycle threshold*- C_t), ou seja, o número de ciclos necessários para que esta detecção ocorra.

A fase logarítmica linear é caracterizada pelo aumento exponencial no sinal fluorescente emitido até que, por limitação dos componentes da reação, o sinal se torna constante (fase platô).

O valor do C_t é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo, ou seja, quanto maior a concentração do material genético na amostra, menor será o número de ciclos necessários para atingir o C_t (ciclo de detecção) (Figura 2A). Esta relação é linear, conforme pode ser verificado na Figura 2B (Mocellin et al., 2003).

A PCR-RT baseia-se na detecção da fluorescência que é gerada por uma molécula repórter (fluoróforo) que aumenta enquanto a reação ocorre. Isso acontece devido ao acúmulo do produto de PCR em cada ciclo de amplificação (Orlando et al., 1998; Wong e Medrano, 2005).

A fluorescência detectada na PCR-RT é gerada pelo emprego de marcadores fluorescentes com modos de ação específicos. Dentre os diversos tipos de princípios fluorogênicos existentes no mercado cabe destacar o corante SYBR[®] Green, os sistemas de hidrólise TaqMan[®] e MGB Eclipse[™], a sonda em forma de alça, como Molecular beacon, e as sondas de hibridização.

Figura 1. Representação esquemática das diferentes fases da PCR-RT. ◆ = amostra controle; ■ = amostra com DNA alvo; R_n = intensidade do sinal fluorescente; a) fase linear; b) exponencial inicial; c) logarítmica-linear; d) platô. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

SYBR® Green (Molecular Probes) é um corante fluorescente altamente sensível que se liga à dupla-fita de DNA (Ramos-Payán et al., 2003). Em uma mistura de reação PCR, a fluorescência aumenta quando este corante está ligado ao DNA dupla-fita (Figura 3b) e é baixa quando não está ligado (Figura 3a). A incorporação de SYBR® Green I na reação de PCR-RT permite a detecção de qualquer DNA dupla-fita gerado durante a PCR. Como a quantidade de DNA dupla-fita aumenta com os ciclos, a intensidade da fluorescência também é aumentada. Este corante permanece estável durante toda a reação de amplificação e a fluorescência é captada por filtros existentes no equipamento.

A)

B)

Figura 2. Representação esquemática de curvas padrão geradas na PCR-RT indicando: A) que valor C_t é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo; B) variação linear de amplificação conforme o número de cópias de DNA obtidas pela PCR-RT. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

Figura 3. Princípio fluorogênico do corante SYBR[®] Green. A emissão de fluorescência é aumentada quando o corante se liga ao DNA dupla-fita (b) e é baixa quando não está ligado (a). Adaptada de Wong e Medrano (2005).

O sistema TaqMan[®] (Roche Molecular System) é o mais utilizado em PCR-RT e é desenhado para hibridizar em regiões internas de um produto PCR. Este sistema baseia-se na atividade 5'-exonuclease da DNA polimerase e utiliza um oligonucleotídeo (sonda) com um corante repórter anexado ao terminal 5' e um corante silenciador anexado no terminal 3' (Figura 4A). Enquanto fluoróforo e silenciador estão próximos, na sonda intacta, a energia emitida pelo primeiro é parcialmente absorvida pelo segundo por transferência de energia fluorescente ressonante (FRET). A energia não absorvida é observada como fluorescência de fundo (Applied Biosystems, 2008). Durante a reação de amplificação a sonda é hidrolizada, os dois corantes são separados e a fluorescência emitida é captada por filtros do equipamento (Figura 4B). O corante repórter mais utilizado é o 6-carboxi-fluoresceína (FAM) e o corante silenciador é o 6-carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA).

A reação de amplificação acontece numa placa termocicladora com 96 poços que são iluminados pela disposição de 96 lâmpadas de diodos (LED) para excitação do corante. A detecção da fluorescência é realizada em dois canais diferentes: no canal 1 o comprimento de onda é de 523-543 nm e no canal 2, de 540-700 nm (Eurogentec, 2008).

Outro sistema de detecção está baseado na sonda Minor Groove Binder (MGB Eclipse[™]) (Epoch Biosciences). Este sistema combina a tecnologia MGB[™] Eclipse Dark Quencher e propriedades de bases modificadas (super G[™], super A[™] e super T[™]).

Figura 4. Princípio fluorogênico do sistema TaqMan®. A) o corante repórter (R) e o silenciador (Q) estão ligados à sonda. B) durante extensão, a DNA polimerase libera o corante repórter da sonda, permitindo a emissão de fluorescência. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

O mecanismo de ação do sistema MGB Eclipse™ envolve três estágios para cada ciclo da PCR. Durante a fase inicial, devido à sua hidrofobicidade e à temperatura de desnaturação, a sonda MGB Eclipse™ assume a forma randômica espiral (Figura 5 A). A fluorescência do corante repórter é silenciada pela proximidade do corante silenciador Eclipse Dark Quencher. Durante o anelamento, a sonda MGB se desdobra e pareia na região complementar do DNA alvo fazendo com que o corante silenciador Eclipse Dark Quencher seja separado do corante repórter, emitindo fluorescência. Durante a fase de extensão, a sonda MGB Eclipse™ é deslocada de sua posição permitindo a geração da cópia do DNA alvo. Segundo Wong e Medrano (2005), quando se usa MGB nas reações, obtém-se o aumento da temperatura de fusão, o que permite o uso de sondas mais curtas.

As sondas Molecular beacons, assim como TaqMan® e MGB Eclipse™, também empregam FRET. Molecular beacons são sondas de hibridização contendo oligonucleotídeos fita-simples que formam uma estrutura que consiste de quatro partes: a) alça (seqüência de 18-30 pares de base complementar ao alvo); b) haste (seqüências de 5-7 pares de base complementares entre si e com marcadores nas extremidades); c) fluoróforo localizado na posição 5' da sonda e d) corante silenciador na posição 3' (Figura 6A).

Figura 5. Princípio fluorogênico das sondas MGB Eclipse. Corante repórter (F) localizado no terminal 3' e MGB e Eclipse Dark Quencher (Q) no terminal 5' da sonda. A) sonda com bases modificadas e em forma randômica espiral; B) sonda intacta - fluorescência medida na etapa de pareamento. Adaptada de Amersham Biosciences (2008).

Quando ocorre o pareamento da sonda com a região complementar do alvo, o Molecular beacon é submetido a uma reorganização conformacional espontânea que força a dissociação da haste e o afastamento do fluoróforo do corante silenciador, resultando fluorescência (Figura 6B).

O sistema de sondas de hibridização consiste em dois oligonucleotídeos, sendo um marcado com um corante doador no terminal 3' e o outro com o aceptor no terminal 5' (Bernard e Wittwer, 2000) (Figura 7A). Durante a hibridização das sondas com o alvo, estes fluoróforos ficam próximos e a transferência de energia FRET ocorre. O corante doador (fluoresceína), quando excitado, emite luz de um determinado comprimento. Quando estão próximos, a energia emitida pelo doador excita o corante aceptor, que passa a emitir fluorescência, porém em um comprimento de onda diferente (Figura 7B).

Qualquer que seja o sistema empregado, a detecção da fluorescência é realizada em um canal de detecção específico no equipamento de PCR-RT e a quantidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo gerada durante a reação de PCR.

Figura 6. Princípio fluorogênico das sondas Molecular beacons. A) Partes da estrutura do *molecular beacon*: a) alça, b) haste, c) fluoróforo e d) corante silenciador. B) Pareamento da sonda com a região complementar e separação dos marcadores fluorescentes. Adaptada de Molecular beacons (2008).

Para que se possa empregar a PCR-RT como uma ferramenta para quantificação deve-se, primeiramente, estabelecer uma curva padrão. Para prepará-la, diferentes concentrações decimais seriais de células ou cópias de DNA são submetidas à reação de PCR-RT (Lie e Petropoulos, 1998; Mocellin et al., 2003; Levin, 2004). O produto amplificado na PCR-RT é detectado pelo equipamento é analisado pelo *software* e gera, automaticamente, uma curva. Esta baseia-se na relação da concentração logarítmica de células ou cópias de DNA com os valores C_t obtidos pela PCR-RT.

A quantificação por PCR-RT pode ser absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta a cada nova PCR-RT realizada há necessidade de se utilizar padrões, o que é trabalhoso e dispendioso para o laboratório. Entretanto, é indicada quando se pretende comparar dados obtidos em dias ou por laboratórios diferentes (Wong e Medrano, 2005).

Figura 7. Princípio fluorogênico das sondas de hibridização. A) duas diferentes sondas marcadas com um corante repórter no terminal 3' (R1) e um outro corante fluorescente no terminal 5' (R2). B) quando os oligonucleotídeos hibridizam nesta orientação, os dois corantes ficam próximos um ao outro. A energia emitida por R1 excita R2 que, subsequente, emite luz fluorescente em um comprimento de onda maior do que R1. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

Para a quantificação relativa, a curva padrão é gerada uma única vez e os dados são armazenados no equipamento. A cada nova PCR-RT os dados gerados são comparados aos da curva padrão e a concentração de DNA ou da população do microrganismo é estabelecida. Para que os dados gerados possam ser comparados há necessidade de se incluir um padrão externo ou uma amostra referência em cada nova reação (Livak e Schmittgen, 2001; Wong e Medrano, 2005).

Um parâmetro denominado "janela de detecção", ou seja, a amplitude da faixa de detecção de populações bacterianas, ou concentração de DNA, com a PCR-RT, deve ser definido pelo usuário utilizando os padrões adequados. Como padrões pode-se estabelecer o uso do DNA equivalente, que é obtido por espectrometria, ou UFC ou célula equivalente, que são obtidos pela semeadura de diluições da cultura de microrganismo. O emprego de DNA ou célula equivalente deve ser cuidadosamente avaliado para evitar interpretações errôneas (Malorny et al., 2008).

Os métodos que empregam a PCR, ou PCR-RT, apesar de gerarem bons resultados tanto para o diagnóstico de doenças como para a pesquisa de microrganismos em alimentos, ainda não têm a aceitação esperada pelos laboratórios de rotina. Segundo Malorny et al. (2003a, c), isso ocorre porque muitos desses laboratórios têm necessidade de empregar métodos padronizados, que sejam oficialmente reconhecidos por entidades como a ISO. Além disso, para seu emprego há necessidade de pessoas treinadas e capacitadas, de modo que o custo destes métodos torna-se geralmente maior que os convencionais.

Apesar dos métodos baseados na PCR serem rápidos, sua utilização é limitada pela presença de substâncias inibidoras oriundas de uma matriz complexa, como os alimentos, e que podem reduzir ou bloquear a amplificação (Rådström et al., 2004). Vários componentes já foram identificados como inibidores da PCR, incluindo polissacarídeos complexos; compostos fenólicos; metabólitos em fezes; DNases; proteases; sais biliares; substâncias húmicas em solos; íons cálcio em leite; uréia em urina, dentre outros (Rådström et al., 2004; Malorny e Hoorfar, 2005).

Essa presença influencia diretamente o diagnóstico pela PCR e, em particular, a sensibilidade na detecção do microrganismo (Rådström et al., 2004). Como melhoria, os autores sugerem o emprego de uma etapa de purificação pré-PCR e a escolha da polimerase que mais se adeque às necessidades.

Malorny e Hoorfar (2005) também afirmaram que, para eliminar inibidores da PCR, uma etapa de purificação do DNA deve ser incluída antes do processo. Outra restrição ao uso da PCR-RT está relacionada à necessidade de se diferenciar DNA originário de células bacterianas viáveis, viáveis não-cultiváveis (VNC) ou DNA de células mortas que podem ser responsáveis por resultados falsos positivos (Wolffs et al., 2004). Uma forma de se evitar o problema de amplificação de DNA de células mortas é pelo emprego da PCR-transcriptase reversa (RT-PCR).

1.2.3. PCR-transcriptase reversa

O princípio da PCR-transcriptase reversa é fazer o caminho inverso ao da célula, ou seja, a partir de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA), sintetizado pelo microrganismo a partir do DNA e presente no meio, obtém-se *in vitro* o DNA

complementar (cDNA). Uma vez que a produção de mRNA pela célula é necessária para a síntese protéica, seu uso como molde indica a viabilidade celular (Sheridan et al., 1998; Fey et al., 2004). Resumindo, a RT-PCR inicia-se pela produção do cDNA a partir do mRNA molde fita-simples, pela ação de uma DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa). Depois de completada a reação de transcriptase reversa e do cDNA ter sido gerado, uma reação de PCR é iniciada, gerando inúmeras cópias deste cDNA (Figura 8).

A RT-PCR é a técnica mais sensível para a detecção e quantificação do mRNA que se tem disponível se comparada, por exemplo, com o Northern blot. Teoricamente, a RT-PCR permite a detecção de mRNA de uma única célula (Bustin, 2000).

Uma das limitações para o emprego da RT-PCR está relacionada à qualidade do mRNA alvo, uma vez que ele é extremamente vulnerável (Bustin et al., 2004). Além disto, a presença de DNA, as nucleases e as várias etapas de lavagem para purificação do mRNA também podem interferir (Clark, 2005).

Figura 8. Etapas do processo da transcrição reversa (RT-PCR).

A quantificação do mRNA pode ser realizada em uma única etapa ou em duas etapas de reação (Wong e Medrano, 2005). No primeiro caso, todos os reagentes necessários são misturados: dNTP, tampão, transcriptase reversa (RT), o par de *primers* complementares ao mRNA alvo e *Taq* DNA polimerase. Em seguida, o tubo é colocado no equipamento. Quando se emprega a reação em duas etapas, a transcriptase reversa ocorre em um tubo e a PCR em outro.

Há vantagens e desvantagens para esses tipos de procedimentos. O emprego de uma única etapa minimiza erros e variações, entretanto, como o mRNA é rapidamente degradável (cerca de 30 segundos a 20 minutos em *Escherichia coli*) (Carpousis et al., 1999), o emprego de um mesmo mRNA como molde para diferentes ensaios realizados, em um certo período de tempo, pode não apresentar resultados adequados (Wong e Medrano, 2005).

Já a reação em duas etapas permite que diversas determinações sejam realizadas a partir de um mRNA e de seu cDNA correspondente. Este cDNA é estável e pode ser armazenado. A grande vantagem do emprego da reação em duas etapas é a reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que a RT-PCR apresenta variações de eficiência de rendimento. Por outro lado, o risco de contaminação da amostra é aumentado.

O sinal fluorescente detectado na transcriptase reversa-PCR-tempo real (RT-PCR-RT) também é gerado pelo emprego de sondas fluorescentes como as descritas anteriormente (1.2.2). A forma de quantificação também é a apresentada para PCR-RT, ou seja, quantificação absoluta ou quantificação relativa (1.2.2).

A RT-PCR tem sido empregada em conjunto com PCR-RT, permitindo a detecção e a quantificação em tempo real do mRNA. Neste caso, sondas específicas devem ser adicionadas à mistura de reação.

Neste trabalho, o uso conjunto das duas técnicas é denominado RT-PCR-RT.

A eficiência de protocolos empregando tanto a PCR-RT como a RT-PCR-RT depende da escolha dos genes alvos. Estes devem ser conservados e específicos para o gênero ou a espécie. A utilização de genes *housekeeping* é bastante adequada, uma vez que eles são constantemente expressos (Sheridan et al., 1998).

Para *Salmonella*, diversos genes podem ser empregados, dentre eles cabe ressaltar o *ttr* e o *tuf*. O gene *ttr* está envolvido no sistema regulador da tetracionato redutase, que permite que o tetracionato seja usado comoceptor final de elétrons na respiração. Essa enzima necessita de três genes estruturais denominados de *ttrA*, *ttrB* e *ttrC*, que estão localizados internamente na ilha de patogenicidade 2 de *Salmonella* (Hensel et al., 1999) (Figura 9). *ttrS* e *ttrR* são os genes regulatórios necessários para a transcrição do *operon ttrBCA*. Para *Salmonella* e outras enterobactérias, dentre os diversos genes *housekeeping*, os genes codificadores para o fator de elongação EF-Tu (*tuf*) também podem ser empregados por serem bastante conservados, sendo considerados também bons indicadores para estudos filogenéticos (Paradis et al., 2005).

EF-Tu é uma proteína codificada por dois genes, *tufA* e *tufB*, que são praticamente idênticos, porém estão situados em *loci* diferentes (Zuurmond et al., 1999). As proteínas codificadas diferem somente no aminoácido C-terminal, que é glicina em EF-TuA e serina em EF-TuB (Ludwig, et al., 1990). Na Figura 10 A e B, tem-se a localização de *tufA* e *tufB* no cromossomo de *S. Typhimurium*, assim como os nucleotídeos diferentes presentes em ambos.

Figura 9. Organização genética da ilha de patogenicidade 2 de *Salmonella*. Os genes envolvidos na redução do tetracionato estão representados por setas tracejadas. Adaptada de Hensel et al. (1999).

Figura 10. A - mapa dos *operons* contendo *tufA* e *tufB* e sua localização no cromossomo de *S. Typhimurium*. B - comparação de seqüências do *tufA* (cinza) e *tufB* (preto) de *S. Typhimurium* LT2 mostrando a posição de 13 nucleotídeos diferentes com linhas verticais. O comprimento de cada gene é de 1.182 nucleotídeos, excluindo o códon terminal. Adaptada de Abdulkarim e Hughes (1996).

O emprego do gene *tuf* em RT-PCR é bastante promissor, por ser somente transcrito durante a divisão celular, sendo um bom indicador da viabilidade do microrganismo. Segundo Sheridan et al. (1998), EF-Tu é abundantemente produzida pelas células viáveis.

A quantificação de patógenos em amostras de produtos alimentícios tem se tornado cada vez mais importante para que se possa estabelecer, de maneira segura e confiável, o risco daquele alimento em causar ETA, ou seja, é necessária quando se pretende realizar uma avaliação de risco microbiológico.

A avaliação do risco microbiológico baseia-se em dados científicos. Estes dados são necessários para identificar o perigo, para avaliar o potencial de exposição e para estimar a relação dose-resposta (ICMSF, 2002). Embora muitos estudos com patógenos em alimentos tenham sido mundialmente realizados a maioria dos dados são de presença / ausência o que invalida sua utilização na avaliação de risco microbiológico, pois há a necessidade de dados quantitativos.

Há poucos estudos sobre a avaliação quantitativa de *Salmonella* em alimentos, quer seja empregando métodos convencionais, quer seja empregando a PCR-RT. Na Tabela 1, encontram-se alguns estudos sobre quantificação de microrganismos empregando-se PCR-RT e RT-PCR-RT, encontrados no banco de dados Web of Science (outubro/2008).

Assim, fica clara a importância de se buscar métodos rápidos, sensíveis e específicos que permitam a detecção e quantificação de *Salmonella* em matrizes alimentícias. Entretanto, para que o método desenvolvido apresente as

características necessárias, é importante que ele seja testado frente a matrizes que apresentem interferentes importantes, como, por exemplo, fezes e alimentos.

Tabela 1. Alguns estudos sobre quantificação de microrganismos baseados em PCR-RT e RT-PCR-RT.

Método utilizado	Alvo	Matriz	Referência
PCR-RT	<i>Salmonella</i>	leite	Jung et al. (2005)
NMP – PCR-RT	<i>S. Enteritidis</i>	sorvete	Seo et al. (2006)
PCR-RT multiplex	<i>Salmonella</i> , coliformes, <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>swab</i> de carcaças e ambiente	Guy et al. (2006)
filtração – PCR-RT	<i>Salmonella</i>	água de enxágüe de carcaças de frango e água de uso de broto de feijão	Wolffs et al. (2006)
<i>flotation</i> – PCR-RT	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i>	água de enxágüe de carcaças de frango	Wolffs et al. (2007)
captura magnética – RT-PCR-RT	<i>Salmonella</i>	solo e fezes de aves	Jacobsen e Holben (2007)
PCR-RT multiplex – separação	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	carne	Wang et al. (2007)
imunomagnética PCR-RT	<i>S. Typhimurium</i>	carne	Park et al. (2008)

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar a viabilidade de emprego do QIAamp® DNA Stool Mini Kit para extração e purificação de amostras de DNA de *Salmonella*.
2. Validar um ensaio para quantificação direta de *Salmonella* usando a PCR-tempo real (PCR-RT), empregando *ttr*.
3. Desenvolver e validar um ensaio para quantificação direta de *Salmonella* usando a PCR-RT, empregando *tuf*.
4. Desenvolver um ensaio para quantificar *Salmonella* em amostras de alimentos-modelo baseado em transcriptase reversa-PCR-tempo real (RT-PCR-RT).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no Instituto Nacional de Avaliação de Risco (BfR), Laboratório Nacional de Referência de *Salmonella*, localizado em Berlim, Alemanha. Este estudo fez parte do projeto “Efeito da ração probiótica administrada a suínos-modelo previamente contaminados com *Salmonella* Typhimurium DT 104 (BB441)” (Projeto BfR nr. 1350001).

3.1. MATERIAL

3.1.1. Cepas bacterianas

Foram utilizadas 30 cepas de diversos sorovares de *Salmonella* e 30 cepas de outras Enterobacteriaceae pertencentes à coleção de culturas do Laboratório Nacional de Referência de *Salmonella* (BfR) e relacionadas nas Tabelas 2 e 3. As cepas eram mantidas a -70 °C em caldo soja triptica se (TSB) (Merck, Alemanha), adicionado de 20% de glicerol (Roth, Alemanha).

Neste estudo, a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium DT 104 foi chamada de *Salmonella* Typhimurium.

A cepa de *Salmonella* Typhimurium DT 104 (BB441), usada em diversos experimentos, apresenta as seguintes características: resistência à ampicilina (AMP), ao cloranfenicol (CM), à estreptomicina (SM), à sulfonamida (SU), à tetraciclina (TC), ao ácido nalidíxico (NAL) e à canamicina (KAN), além de ser marcada com proteína verde fluorescente (GFP).

3.1.2. Material fecal

Fezes suínas foram obtidas de animais que tinham quatro semanas de idade e eram da raça híbrida Pietrain x Duroc. Antes dos animais serem infectados com *Salmonella*, as fezes de todos foram coletadas e submetidas, após extração, à PCR-RT para a verificação da presença de *Salmonella* endógena. As amostras foram mantidas congeladas a -20 °C como controle negativo.

O total de treze suínos foi oralmente infectado com *S. Typhimurium* DT 104 (BB441), empregando-se dois mililitros de um cultivo contendo aproximadamente $6,0 \times 10^9$ UFC/mL por animal.

Tabela 2. Cepas de *Salmonella* usadas nos testes de inclusividade para o método PCR-RT.

Sorovar (fagotipo)	Identificação
<i>S. Agona</i>	99-00029
<i>S. Bovismorbificans</i>	00-00430
<i>S. Brandenburg</i>	00-00706
<i>S. Bredeney</i>	00-00215
<i>S. Blockley</i>	98-01262
<i>S. Derby</i>	99-00418
<i>S. Dublin</i>	98-00454
<i>S. Enteritidis</i> (PT4)	00-00004
<i>S. Enteritidis</i> (PT8)	99-02433
<i>S. Hadar</i>	99-00601
<i>S. Heidelberg</i>	00-00935
<i>S. Infantis</i>	99-01857
<i>S. Livingstone</i>	00-00411
<i>S. Montevideo</i>	98-00037
<i>S. Newport</i>	99-00095
<i>S. Paratyphi</i> B d-tartarato +	99-01168
<i>S. Saintpaul</i>	00-02151
<i>S. Typhi</i>	
	<i>Tox 3</i>
<i>S. Typhimurium</i> (DT8)	98-01743
<i>S. Typhimurium</i> (DT120)	99-00350
<i>S. Typhimurium</i> (DT104)	00-00510
<i>S. Typhimurium</i> (DT104)	BB441
<i>S. Typhimurium</i> (DT104)	51K61
<i>S. Virchow</i>	00-01570
<i>S. enterica</i> ssp. II 42:r:-	97-00565
<i>S. enterica</i> spp. IIIa 21:g,z51:-	00-01041
<i>S. enterica</i> spp. IIIb 18:l,v;z	00-02040
<i>S. enterica</i> spp. IV 16:z4,z32:-	00-00262
<i>S. bongori</i> 66:z65:-	K-1354
<i>S. enterica</i> spp. VI 45:a:e,n,x	00-01307

Tabela 3. Cepas de enterobactérias usadas para testes de exclusividade para o método PCR-RT.

Espécies	Identificação
<i>Citrobacter freundii</i>	01-3353
<i>Citrobacter freundii</i>	01-675
<i>Citrobacter diversus</i>	01-3607
	02-3625
<i>Citrobacter</i>	
<i>analomaticus</i>	
<i>Enterobacter amnigenus</i>	M36/03D 10
<i>Enterobacter agglomerans</i>	M41/03A 4
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053
<i>Enterobacter gergoviae</i>	02-3719
<i>Escherichia coli</i> O78:H4	EC 163
<i>Escherichia coli</i> O22:H8	EC 71
<i>Escherichia coli</i> O26:H11	EC 277
<i>Escherichia coli</i> K12	DSM 498
<i>Escherichia vulneris</i>	98-1615
<i>Escherichia fergusonii</i>	96-400
<i>Enterococcus faecalis</i>	O615SP
<i>Hafnia alvei</i>	01-864
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CB 2132
<i>Morganella morganii</i>	CB 1631
<i>Providencia alcalifaciens</i>	01-656
<i>Providencia stuartii</i>	04-940
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479
<i>Proteus vulgaris</i>	02-3082
<i>Shigella boydii</i>	5/95
<i>Shigella boydii</i>	EU-NS 38
<i>Shigella flexneri</i> 2a	893/85
<i>Serratia marcescens</i>	EU-NS 36
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833

Dois grupos contendo quatro animais, um grupo com três e outro com dois foram mantidos em um estábulo de biossegurança nível dois até o abate (28 dias após a infecção). As fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais em frascos estéreis e transportadas para o laboratório, onde foram utilizadas nos

experimentos para quantificação de *Salmonella* por PCR-RT e por método convencional.

O material fecal foi colhido de acordo com a disponibilidade, preferivelmente nos dias 1, 2, 3, 4, 6, 8, 13, 15, 20, 22 e 28 após infecção.

A infecção, o cuidado e o controle dos suínos estiveram a cargo de István Szabó, do Grupo de Diagnóstico Molecular e Genético, do Departamento de Segurança Biológica do Instituto Federal de Avaliação de Risco, estando de acordo com padrões internacionais para experimentos com animais, que contemplam os aspectos éticos em procedimentos desta natureza.

3.1.3. Alimentos-modelo

Carne suína refrigerada e carcaça inteira de frango congelado foram compradas em um supermercado local. A carcaça de frango foi lentamente descongelada a 10 °C por três dias na embalagem original. Todo o líquido liberado foi coletado em tubos estéreis de 50 mL Opticul™ polipropileno (Falcon; Becton Dickinson Co. Lincoln Park, New Jersey). Este líquido foi empregado como alimento-modelo ave.

Para obter o modelo com carne suína, 50 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9% (p/v) (Merck) foram adicionados a 100 g de lombo fatiado (*Longissimus dorsi*) e homogeneizados com *stomacher* (Stomacher® 400, London, UK) por dois minutos à alta velocidade. O suco foi coletado em um tubo Falcon e centrifugado por 10 min a 3.161 x g para remover partículas de carne. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e denominado alimento-modelo suíno.

Os caldos preparados foram armazenados a -20 °C até o momento de uso.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo do inóculo para contaminação dos suínos

Uma alíquota de um mililitro da cultura *overnight* da cepa de *S. Typhimurium* (BB441) foi inoculada em 50 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Merck) contendo canamicina (50 µg/mL concentração final). O frasco foi incubado sob agitação moderada a 37 °C. As células de *S. Typhimurium* foram coletadas quando a cultura atingiu a densidade fotoelétrica de 300 Klett (aproximadamente $3,0 \times 10^9$ UFC/mL). A densidade foi mensurada usando-se um colorímetro fotoelétrico celular de vidro (Klett-Summerson, 8003, EUA).

Em seguida, 45 mL da suspensão foram transferidos para um tubo Falcon e centrifugados (Eppendorf) a 3 °C por 15 min a $4.000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com solução estéril de cloreto de sódio 0,9% (p/v) estéril. As células foram ressuspensas em 40 mL de solução estéril de peptona a 1% (Merck) e agitadas com *vortex*.

Empregaram-se dois mililitros do cultivo por animal (aprox. $6,0 \times 10^9$ UFC/mL).

3.2.2. Avaliação quantitativa e qualitativa de *Salmonella* em amostras de fezes suínas por método clássico

A análise quantitativa de *Salmonella* baseada no método de cultivo direto foi realizada no Instituto Federal de Avaliação de Risco, Departamento de Segurança Biológica, Grupo de Diagnóstico Molecular e Genético por István Szabó.

Na Figura 11, encontra-se a representação esquemática do protocolo empregado para a quantificação de *S. Typhimurium* pelo método de semeadura em placa.

Alíquotas de 10 g de fezes frescas foram diluídas 1:10 em água peptonada 1% tamponada (Merck). Amostras foram homogeneizadas em *stomacher*, por dois minutos, à velocidade máxima, e diluições decimais foram preparadas. Alíquotas de 100 µL de cada diluição serial foram semeadas, em

Figura 11. Protocolo para quantificação de *S. Typhimurium* em amostras de fezes suínas. BPW = água peptonada tamponada; XLD^{Nal50} = ágar xilose lisina desoxicolato suplementado com ácido nalidíxico (50 µg/mL concentração final); *S. Typhimurium* DT 104 (BB441 - resistente à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, ácido nalidíxico, kanamicina e marcada com proteína verde fluorescente). UFC eq (Unidade Formadora de Colônia equivalente) = valor C_t obtido por PCR-RT para uma determinada concentração de células bacterianas quando comparado ao valor C_t obtido para a curva padrão e relacionado à concentração de DNA ou células.

duplicata, na superfície de ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Oxoid, Alemanha) suplementado com ácido nalidíxico (XLD^{Nal50}) (Oxoid), utilizando-se o Spiral Plater WASP (Whitley, RU).

As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C e colônias típicas foram automaticamente contadas com o contador de colônias ProtoCOL 60.000 (Synoptics Ltd., RU).

Quando populações menores que 100 UFC/g de fezes eram esperadas, utilizou-se o método de espalhamento superficial, com auxílio de alça de Drigalski, sendo duas placas inoculadas com 0,3 mL cada e uma placa com 0,4 mL. Este método apresenta limite de detecção de 10 UFC/g. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, as colônias típicas (negras) foram contadas e a população média de *Salmonella* foi calculada e expressa em UFC/g.

Para o método qualitativo, empregou-se o ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) (Merck). O homogeneizado remanescente foi transferido para um frasco estéril e incubado por 16 h a 37 °C. Deste cultivo, três alíquotas de 0,1 mL cada foram aplicadas na superfície de placa contendo ágar MSRV. As placas foram incubadas a 42 °C por 72 h e a presença de *Salmonella* foi avaliada como positiva, quando houve presença de migração, ou negativa, na ausência.

3.2.3. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação direta de *Salmonella* por PCR-RT empregando o gene *ttr*

3.2.3.1. Preparo da curva padrão empregando cultura pura de *Salmonella*

Uma alíquota de um mililitro da cultura *overnight* da cepa de *S. Typhimurium* (BB441) foi inoculada em 20 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL concentração final). Os frascos foram incubados sob agitação de 100 rpm a 37 °C. As células de *S. Typhimurium* foram coletadas quando a cultura atingiu a densidade fotoelétrica de 120 Klett (aproximadamente $3,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Diluições decimais seriais da suspensão celular foram preparadas em solução de cloreto de sódio (0,9% p/v) estéril até a variação de sete unidades logarítmicas. As diluições preparadas foram alíquotadas e armazenadas a -

20 °C. Triplicatas das diferentes concentrações de células foram utilizadas na padronização da PCR-RT.

Para a determinação da população de *Salmonella* presente nas alíquotas utilizadas, porções de 100 µL das diluições 10^{-3} e 10^{-2} foram espalhadas superficialmente, em duplicata, com auxílio de alça de Drigalski sobre ágar LB (Merck). O mesmo volume foi aplicado sobre ágar XLD^{Nal50} usando o Spiral Plater WASP, porém em quadruplicatas. As placas de ágar LB foram incubadas a 37 °C por 18-24 h e as placas contendo o XLD^{Nal50} por 48 h na mesma temperatura. A população média obtida em cada ágar foi determinada e expressa em UFC/mL.

Este procedimento foi repetido por quatro vezes com as alíquotas mantidas a -20 °C.

3.2.3.1.1. Extração e purificação do DNA de *Salmonella*

A cepa de referência *S. Typhimurium* DT 104 (BB441) foi extraída e purificada com o DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, 2006), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações.

Uma alíquota de 1,5 mL da cultura *overnight* em LB (aproximadamente $1,0 \times 10^9$ UFC) foi centrifugada por quatro minutos a $20.000 \times g$ à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensionado em 180 µL de tampão ATL. Uma alíquota de 25 µL de solução de proteinase K foi adicionada e misturada por *vortex* e a suspensão foi incubada em banho-maria (Mettler) a 55 °C por três horas até a completa lise celular.

Adicionaram-se aos tubos quatro microlitros de solução de RNase A (100 mg/mL) (Qiagen) e estes foram incubados por dois minutos à temperatura ambiente. A seguir, 200 µL de tampão AL foram adicionados e misturados por *vortex* e o tubo foi incubado a 70 °C por 10 min em um bloco de aquecimento (bloco Eppendorf *comfort* 1,5 mL, Alemanha) com suave agitação. Uma alíquota de 200 µL de etanol p.a. foi adicionada e misturada, vigorosamente, por *vortex*. O lisado foi aplicado sobre a membrana da coluna Qiagen e centrifugado a $10.000 \times g$ por um minuto (Eppendorf 5402). A coluna foi lavada com 500 µL de tampões AW1 seguido do AW2. A coluna foi centrifugada a $10.000 \times g$ por um minuto após a primeira lavagem e $10.000 \times g$ por dois minutos após a segunda lavagem.

3.2.3.1.2. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando o gene *ttr*

O protocolo, os *primers* e a sonda usados na PCR-RT para a quantificação foram baseados em Malorny et al. (2004). Os *primers* e a sonda TaqMan[®] usados neste ensaio estão apresentados na Tabela 4. Na Figura 11, encontra-se a representação esquemática do protocolo para a quantificação de *Salmonella* pelo método PCR-RT.

Os *primers* dessalinizados foram obtidos da empresa BioteZ (Berlim, Alemanha) e a sonda TaqMan[®] da Eurogentec (Bélgica). A sonda foi marcada no terminal 5' com um corante repórter 6-carboxifluoresceína (FAM) e no 3' com Eclipse Dark Quencher (EDQ).

A PCR consistiu de 50 µL de mistura de reação contendo 400 nM de cada *primer* (ttr-4R e ttr-6F); 250 nM da sonda (ttr-5); 200 µM cada de dGTP, dATP, dCTP e 400 µM dUTP (Roth); 1 x tampão de PCR (20 mM Tris-HCl [pH 8,4], 50 mM KCl) (Invitrogen, Alemanha); 4,5 mM MgCl₂; e 1 µg/µL de soro albumina bovina (BSA) (Roth); 1 U de Platinum *Taq* polimerase (Invitrogen); e 5 µL das células preparadas conforme 3.2.3.1. As amostras foram colocadas no equipamento DNA Engine Opticon[®] 2 System de detecção contínua de fluorescência (MJ Research[™] Inc. Massachusetts, EUA) e o seguinte programa foi utilizado: 50 °C por 2 min, 95 °C por 1 min (etapa de desnaturação primária) seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 65 °C por 30 s.

3.2.3.1.3. Cálculo da curva padrão obtida para gene *ttr*

Os resultados obtidos em 3.2.3.1.2 foram registrados e analisados com o programa Opticon Monitor[™] Analysis Software (versão 2.02). Para efeitos de padronização, o limiar de detecção (*threshold line*) para calcular o número do *threshold cycle* (C_t) foi definido como valor de fluorescência 0,03.

A curva padrão, a equação linear e o coeficiente de regressão linear (R²) foram automaticamente gerados pelo programa Opticon Monitor com base na população do patógeno (3.2.3.1) inserida na “janela de detecção”. O valor da inclinação da equação linear foi usado para determinar a eficiência de amplificação (EA) através da fórmula $[10^{(-1/\text{inclinação})}] - 1$.

Os resultados obtidos foram transferidos para a planilha Microsoft Office Excel (Microsoft Windows, 1997, Versão 8.0) e as funções log, potência, matriz múltipla, média, tendência e o desvio padrão foram calculados. Definiu-se UFC eq o valor C_t obtido por PCR-RT para uma determinada concentração de células bacterianas quando comparado ao valor C_t , obtido para a curva padrão e relacionado à concentração de DNA ou células.

Tabela 4. Seqüência dos *primers* e da sonda usados para o ensaio de quantificação de *Salmonella* por PCR-RT, conforme descrito por Malorny et al. (2004).

<i>Primer/Sonda</i>	Seqüência (5' → 3')	Posição no gene ^a	Temp. de <i>melting</i> (°C) ^b
ttr-6F	ctcaccaggagattacaacatgg	4287-4309	57
ttr-4R	agctcagaccaaagtgaccatc	4359-4381	58
Sonda (ttr-5)	FAM-cacccgacggcgagaccgacttt-EDQ	4336-4356	68

^aposição corresponde ao número de acesso AF282268 no GenBank

^bcalculada com o programa Primer Express® (Applied Biosystems)

3.2.3.2. Extração e purificação do DNA de *Salmonella* a partir de fezes suínas naturalmente contaminadas

O DNA de *Salmonella* foi purificado a partir de amostras de fezes suínas através do uso do QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemanha). A purificação do DNA foi realizada de acordo com as instruções do manual do fabricante (Qiagen, 2007), com pequenas modificações descritas a seguir. Foram pesados, em duplicata, 200 ± 20 mg de material fecal em tubo de microcentrifuga estéril de dois mililitros. Adicionou-se ao material fecal 1,4 mL de tampão de lise ASL, misturou-se continuamente por *vortex*, até completa homogeneização, e aqueceu-se a suspensão por 15 min a 80 °C em banho- maria (Mettmert WB/OB 7, Alemanha). A seguir, a suspensão foi homogeneizada por *vortex* por 15 s e centrifugada a 20.000 x g (centrífuga Eppendorf 5402, Alemanha) por um minuto.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga estéril contendo um tablete InhibitEX que foi imediata e continuamente submetido ao *vortex* até completa suspensão (aprox. um minuto). A amostra foi centrifugada a

20.000 x g por seis minutos. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga estéril contendo 17 µL de Proteinase K (Qiagen), 200 µL de tampão de lise AL foram adicionados e vigorosamente misturados. A solução homogênea foi incubada em banho-maria (Memmert) a 70 °C por 10 min. A seguir, 200 µL de etanol p.a. (Merck) foram adicionados ao lisado e misturados por *vortex*.

Todo o volume foi aplicado na coluna QIAamp®, que foi centrifugada a 20.000 x g por um minuto. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão AW1 seguido de mesmo volume de tampão AW2. A coluna foi centrifugada à velocidade de 20.000 x g por um minuto após a primeira lavagem e dois minutos após a segunda lavagem. O tampão residual foi eliminado por centrifugação adicional por três minutos à velocidade máxima (20.000 x g). A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga estéril e 100 µL de tampão AE foram aplicados diretamente sobre a membrana. A coluna foi mantida por dois minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 20.000 x g por dois minutos para eluir o DNA. A suspensão contendo o DNA purificado foi armazenada a -20 °C até o uso.

O DNA bacteriano de duas amostras fecais por animal e por dia foi purificado.

A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm no GeneQuant, RNA/DNA *calculator* (Amersham, Suécia).

3.2.3.3. Quantificação por PCR-RT de *Salmonella* em fezes suínas naturalmente contaminadas

A quantificação de *Salmonella* baseou-se no descrito no item 3.2.3.1.2, empregando-se uma alíquota de cinco microlitros da amostra de DNA preparada conforme 3.2.3.2. Os valores obtidos na quantificação foram ajustados para grama de fezes.

3.2.3.4. Preparo da curva padrão empregando DNA purificado de *Salmonella* artificialmente inoculada em fezes suínas

Porções de 200 ± 20 mg de fezes suínas isentas de *Salmonella* foram pesadas em tubos Eppendorf de dois mililitros e cada porção foi inoculada com

100 µL de diluições decimais de suspensão celular de *Salmonella* preparada como descrito em 3.2.3.1. A população de *Salmonella* dos inóculos também foi determinada conforme 3.2.3.1. Cada concentração do patógeno foi inoculada em quadruplicata e testada. O DNA microbiano das amostras artificialmente contaminadas foi purificado usando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit, conforme descrito em 3.2.3.2, e submetido à PCR-RT conforme apresentado em 3.2.3.3. A curva padrão foi preparada conforme 3.2.3.1. Este experimento foi repetido duas vezes.

Alíquotas deste DNA foram mantidas a -20 °C e testadas para avaliar sua estabilidade.

3.2.3.5. Taxa de recuperação de DNA de *Salmonella* purificado empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit

A taxa de recuperação de DNA de células de *Salmonella* artificialmente inoculadas em fezes foi definida como sendo a relação entre o valor da UFC equivalente obtido com a amostra artificialmente contaminada e submetida à extração empregando-se o QIAamp® DNA Stool Mini Kit (3.2.3.2) e o valor de UFC equivalente obtido pelo emprego de cultura pura de *Salmonella* (3.2.3.1).

Os resultados obtidos foram transferidos para planilha Microsoft Office Excel e as mesmas funções apresentadas no item 3.2.3.1.3 foram usadas.

3.2.4. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando *tuf*

3.2.4.1. Desenho dos *primers* e da sonda

Para o desenho de *primers* e da sonda específica para o gene *tuf* comparou-se a sequência do gene *tuf* de 13 salmonelas (compreendendo diferentes espécies, subespécies e sorovares) e de 45 espécies de outros microrganismos proximamente relacionadas conforme Paradis et al. (2005).

O alinhamento múltiplo das seqüências foi obtido com o programa Discovery Studio® Gene versão 1.5 (Accelrys® Inc., RU) e somente seqüências

exclusivas de *Salmonella* foram selecionadas. Regiões específicas para *Salmonella* dentro do alinhamento múltiplo *tuf* foram identificadas. Baseado nestas regiões, um par de *primers* e uma sonda Minor Groove Binder (MGB) foram desenhados (Tabela 5). A sonda *tuf*-MGB foi desenhada com o programa Primer Express versão 1.5 (PE Biosystems, RU) e os *primers* foram desenhados manualmente.

Para verificação de especificidade das sondas e dos *primers* desenhados foi realizado o alinhamento das seqüências empregando o BLASTN no GenBank (versão 2.2.14.) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os *primers* dessalinizados foram produzidos pela BioteZ (Berlim, Alemanha) e a sonda *tuf*-MGB pela Applied Biosystems (Foster City, EUA).

Tabela 5. Seqüência dos *primers* e da sonda desenhados para detecção e quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando *tuf*.

Primer/Sonda	Seqüência (5' → 3')	Posição no gene ^a	Temp. de <i>melting</i> (°C) ^b
<i>tuf</i> -5F	aacgcggtatcatcaaagtg	397-418	55
<i>tuf</i> -6R	gaacacctacgttctcaccg	518-536	54
Sonda (<i>tuf</i> -MGB)	FAM-aaagagactcagaagtc-MGBNFQ	446-462	67

^a posição corresponde ao número de acesso AE008893 no GenBank

^b calculada com o programa Primer Express® (Applied Biosystems)

3.2.4.2. Preparo das células bacterianas

Todas as cepas bacterianas, tanto de *Salmonella* sp. como das outras espécies empregadas (Tabelas 2 e 3), foram cultivadas em caldo LB a 37 °C por 18 a 20 h, com agitação de 100 rpm.

Uma alíquota de um mililitro da cultura foi centrifugada por quatro minutos a 20.000 x g (Eppendorf 5402), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 300 µL de tampão Tris-EDTA (TE) [10 mM Tris, 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] (Roth). A suspensão foi aquecida em banho-maria (Mettler) por 10 min a 100 °C. A suspensão foi resfriada por um minuto em gelo e centrifugada (20.000 x g) por dois minutos a quatro graus. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga estéril e uma alíquota de cinco microlitros foi diluída 1:10 em TE (pH 8,0) e usada como molde no ensaio PCR-RT.

3.2.4.3. PCR-RT empregando o gene *tuf*

A PCR foi conduzida em 50 µL de mistura contendo 400 nM de cada um dos *primers* *tuf*-5F e *tuf*-6R, 200 nM da sonda *tuf*-MGB; 200 µM de cada dNTP (Roth); 1 x tampão de PCR (20 mM Tris-HCl [pH 8,4], 50 mM KCl) (Invitrogen); 1,5 mM MgCl₂; 1 U de Platinum *Taq* polimerase (Invitrogen) e cinco microlitros da amostra preparada como descrito em 3.2.4.2.

As amostras foram transferidas para o equipamento DNA Engine Opticon[®] 2 System de detecção contínua da fluorescência e o seguinte programa utilizado: 95 °C por um minuto seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 62 °C por um minuto.

3.2.4.3.1. Avaliação do teste de PCR-RT quanto à exclusividade e à inclusividade empregando *tuf*

Os valores de C_t obtidos na PCR-RT foram analisados quanto à exclusividade e à inclusividade das cepas bacterianas testadas (Tabelas 2 e 3). Definiu-se exclusividade como sendo a não emissão de sinal pelas cepas não-alvo no método PCR-RT e inclusividade como a capacidade do método PCR-RT de detectar o analito alvo (*Salmonella* sp.).

3.2.5. Desenvolvimento de um ensaio baseado no gene *tuf* para a quantificação de *Salmonella* sp. por transcriptase reversa-PCR-tempo real (RT-PCR-RT)

3.2.5.1. Preparo da curva padrão do *tuf*-RNA

3.2.5.1.1. Desenho dos *primers*

Os *primers* a serem empregados foram desenhados buscando a amplificação de um fragmento de 974 pb do gene *tuf*. Utilizou-se o programa Array Designer versão 4.2 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, EUA). No terminal 5' do *primer forward* a sequência do promotor T7 foi adicionada. Esta adição visou à transcrição *in vitro* pela enzima T7 polimerase. Na Tabela 6,

encontram-se as seqüências dos dois *primers* e na Tabela 7 a localização dos mesmos.

Tabela 6. Seqüência de *primers* usados para a RT-PCR-RT do gene *tuf* de *Salmonella*.

<i>Primer</i>	Seqüência ^a (5' → 3')	Posição no gene ^b	Temp. de <i>melting</i> (°C)
tuf-T7F	<u>taatacgactcactatagggctgaccgctgccattactac</u>	82-91	63
tuf-7R	cattaccatctctacgccttcc	1035-1056	50

^aseqüência sublinhada corresponde ao promotor T7

^bposição corresponde ao número de acesso AE008858 no GenBank

3.2.5.1.2. Transcrição *in vitro* do gene *tuf* modificado de Fey et al. (2004)

A primeira etapa consistiu da amplificação *in vitro* do fragmento de 974 pb do gene *tuf*. Para tanto, uma mistura de PCR, com volume final de 50 µL, contendo 400 nM de *primers* tuf-T7F e tuf-7R, 200 µM de cada dNTP (Roth); 1 x tampão de PCR [20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl]; 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Platinum *Taq* polimerase (Invitrogen) e cinco microlitros de DNA molde derivado da cepa *S. Typhimurium* DT 104 (BB441 e 51K61), preparado conforme apresentado em 3.2.3.2, foi empregada. As condições de tempo-temperatura foram: desnaturação inicial de 95 °C por um minuto, 30 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, usando-se o equipamento GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

O produto de PCR esperado (974 pb) foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 1 x Tris-Borato-EDTA (TBE) [0,1 M Tris; 0,09 M ácido bórico; 0,001 M EDTA (pH 8,0)] e a banda visualizada sob UV após exposição ao brometo de etídio. O produto da PCR foi purificado usando o QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, 2003), de acordo com as instruções do fabricante e descritas a seguir. A composição dos reagentes utilizados e apresentados como abreviaturas não foi informada pelo fabricante.

Tabela 7. Localização e seqüência dos *primers tuf* desenvolvidos para detectar e quantificar *Salmonella* sp. por RT-PCR-RT. Acesso ao GenBank em 14/08/06.

Seqüência					
1					
gtgtctaaag	aaaaatttga	acgtacaaaa	cgcacggtta	acgtcgggtac	tatcggccac
ggtgaccatg	gtaaaacaac	gctgaccgct	gccattacta	ccgtactggc	taaaacctac
ggcggtgccg	ctcgcgcatt	cgaccagatc	gataacgcgc	cggaagaaaa	agcgcgtggt
atcaccatca	acacttctca	cgttgaatac	gataccccga	cccgccacta	cgcacacgta
gactgcccgg	ggcacgctga	ctatgttaaa	aacatgatca	ccggtgctgc	tcagatggac
ggcgcgatcc	tggttggtgc	tgcgactgac	ggcccgatgc	cgcagaccgc	tgagcacatc
ctgctgggtc	gtcaggtagg	cgttccgtac	atcatcgtgt	tcctgaacaa	atgcgacatg
gttgatgacg	aagagctgct	ggaactgggt	gagatggaag	ttcgcgaact	gctgtctcag
tacgacttcc	cgggcgacga	cactccgac	gttcgtgggt	ctgctctgaa	agcgcgtgga
ggcgacgcag	agtgggaagc	gaaaatcatc	gaactggctg	gcttcctgga	ttcttatatt
ccggaaccag	agcgtgcgat	tgacaagccg	ttcctgctgc	cgatcgaaga	cgtattctcc
atctccggtc	gtggtaccgt	tgttaccggt	cgtgtagagc	gcggtatcat	caaagtgggc
gaagaagttg	aaatcgttgg	tatcaaagag	actcagaagt	ctacctgtac	tggcgttgaa
atgttccgca	aactgctgga	cgaaggccgt	gccggtgaga	acgtaggtgt	tctgctgcgt
ggtatcaaac	gtgaagaaat	cgaacgtggg	caggtagctg	ctaagccggg	caccatcaag
ccgcacacca	agttcgaatc	tgaagtgtac	attctgtcca	aagatgaagg	cggccgtcat
actccgttct	tcaaaggcta	ccgtccgcag	ttctacttcc	gtactactga	cgtgactggg
accatcgaac	tgcc <u>ggaagg</u>	<u>cgtagagatg</u>	<u>gtaatg</u> ccgg	gcgacaacat	caaatgggt
gttaccctga	tccacccgat	cgcgatggac	gacggtctgc	gtttcgcaat	ccgtgaaggc
ggccgtaccg	ttggcgcggg	cgttggtgct	aaagttctgg	gctaa	

1185

primer forward (negrito) – 5'-ctgaccgctgccattactac-3'

primer reverse (negrito e sublinhado) – 5'-cattaccatctctacgccttcc-3'

Alíquotas de 250 µL de tampão PB foram adicionadas a 45 µL de produto da PCR. A mistura foi então aplicada na coluna e centrifugada por um minuto a 18.571 x g. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e 750 µL de tampão de lavagem PE foram adicionados, sendo novamente centrifugada nas mesmas condições. A amostra purificada foi eluída usando-se 50 µL de tampão EB e centrifugada por um minuto a 20.000 x g.

A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm no GeneQuant, RNA/DNA *calculator*.

O produto purificado da PCR foi transcrito usando-se o Riboprobe *in vitro* Transcription System (Promega). A mistura de reação, com volume final de 50 µL, composta de 1 x tampão Transcription Optimized; 10 mM de DTT; 2,5 mM de cada dNTP; 40 U de RNasin® Ribonuclease Inhibitor; 20 U de T7 RNA polimerase; água livre de nuclease (q.s.p. 50 µL); concentração de DNA purificado (q.s.p. uma concentração final de aprox. 90 µg/µL), foi incubada com suave agitação em um bloco de aquecimento por 90 min a 38 °C.

Após a transcrição *in vitro*, adicionou-se, no tubo, RQ1 RNase-free DNase na proporção de 1 U/ μ g do DNA molde e incubou-se o tubo em bloco de aquecimento por 30 min a 37 °C para desnaturar o DNA. O produto foi purificado usando-se o QIAquick® Kit (Qiagen). Todas as soluções foram previamente tratadas sob luz UV por 30 min para eliminar possível presença de DNA ou nucleases.

O transcrito foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1 x Tris-Acetato-EDTA (TAE) [0,04 M Tris-acetato; 0,001 EDTA (pH 8,0)] contendo 0,65% de formaldeído. Como marcador de peso molecular padrão empregou-se RiboLadder Short e RiboLadder Long (Bioline GmbH, Alemanha).

A concentração do RNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm no GeneQuant, RNA/DNA *calculator*.

Para o cálculo da concentração de RNA obtido utilizaram-se os critérios estabelecidos por Sambrook et al. (1989), considerando que um nucleotídeo de RNA fita-simples tem peso molecular de 340 Da.

O *tuf*-RNA transcrito foi armazenado a -80 °C.

3.2.5.1.3. Curva padrão

O *tuf*-RNA transcrito (3.2.5.1.2.) foi diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, Alemanha) até a concentração de 2×10^8 cópias de RNA por microlitro. A seguir, foi diluído (1:10) em água tratada com DEPC até concentração de 20 cópias de RNA por microlitro. Estas soluções de RNA foram porcionadas e armazenadas a -80 °C até o momento do uso. De cada concentração de *tuf*-RNA transcrito (2×10^8 a 2×10^1 cópias/ μ L), cinco microlitros foram usados em duplicata no ensaio RT-PCR-RT.

A RT-PCR-RT foi realizada empregando-se o QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen). Este *kit* permite a realização da RT-PCR-RT em tubo único por possuir todos os reagentes necessários, ou seja, “HotStarTaq DNA polymerase”, “ROX passive reference dye” e mistura de dNTP em um tampão otimizado, além das enzimas *Omniscript* e *Sensiscript* para a transcriptase reversa.

A mistura de reação consistiu de 200 nM de cada um dos *primers tuf*-5F e *tuf*-6R (Tabela 4); 200 nM da sonda *tuf*-MGB (Tabela 4); mistura QuantiTect™ Probe RT-PCR, água livre de RNase (q.s.p. 25 μ L) e cinco microlitros do RNA

molde (3.2.5.1.2). Os tubos foram colocados no equipamento DNA Engine Opticon[®] e o seguinte programa utilizado: 50 °C por 30 min (etapa da transcriptase reversa), seguida de 95 °C por 15 min (ativação inicial da HotStar *Taq* DNA polimerase) e 45 ciclos de 94 °C por 15 s e 62 °C por um minuto (amplificação).

Sinais fluorescentes foram detectados no canal FAM e analisados como descrito em 3.2.4.3. O limiar de detecção foi estabelecido em 0,03.

3.2.5.2. Avaliação da estabilidade do RNA transcrito *in vitro*

O tampão de conservação do RNA (RSB – RNA *Safe Buffer*), descrito por Hoffmann et al. (2006) para a estabilização e prevenção da degradação de RNA viral, foi modificado segundo informações daquele autor (Hoffmann, comunicação pessoal). O tampão modificado 2 x RSB consistiu de 100 ng/μL de ácido polideoxiadênílico (poly dA) (Amersham), 0,1% (v/v) Tween 20 p.a. (Serva, Alemanha) e 0,1% (p/v) azida sódica (Merck) em água livre de RNase.

Para avaliar a eficácia do tampão RSB na prevenção da degradação do produto *tuf*-RNA transcrito, os mesmos transcritos foram diluídos em água isenta de RNase (controle) e em tampão RSB, conforme 3.2.5.1.2. Três concentrações finais de cópias *tuf*-RNA ($1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^2$) foram preparadas com cada diluente e armazenadas a -80 °C. Durante quatro dias consecutivos, uma mesma porção de cada concentração e tratamento foi degelada em gelo e submetida, em duplicata, ao RT-PCR-RT, conforme descrito em 3.2.5.1.3, e novamente congelada a -80 °C. Alíquotas de cinco microlitros contendo as mesmas concentrações finais acima foram empregadas na RT-PCR-RT. Os valores C_t obtidos nos quatro dias consecutivos, para ambos os diluentes utilizados, foram comparados estatisticamente.

O limiar de detecção foi manualmente estabelecido em 0,03, por razões de comparação dos valores (C_t) médios.

3.3. Avaliação dos métodos PCR-RT e RT-PCR-RT empregando *tuf* para quantificação de *Salmonella*

3.3.1. Avaliação em meio de cultura

Na figura 12, encontra-se a representação esquemática deste estudo.

3.3.1.1. Preparo da curva padrão de *Salmonella*

Para o preparo da curva padrão de DNA de *Salmonella*, a cepa de referência *S. Typhimurium* DT 104 (BB441) foi purificada com o DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, 2006), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações, conforme descrito em 3.2.3.1.1.

O tampão residual foi eliminado por centrifugação adicional por três minutos à velocidade máxima. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga estéril e 100 µL de tampão AE foram aplicados diretamente sobre a membrana. A coluna foi mantida por dois minutos à temperatura ambiente e depois centrifugada a 20.000 x g por dois minutos para eluir o DNA. A suspensão contendo o DNA purificado foi armazenada a -20 °C até o uso.

A concentração do DNA na amostra foi determinada pela medida da densidade óptica a 260 nm com o GeneQuant, RNA/DNA *calculator*.

Para o cálculo da concentração de DNA obtido utilizaram-se os critérios estabelecidos por Sambrook et al. (1989), que consideram que um nucleotídeo de DNA fita-simples tem peso molecular de 660 Da.

A amostra foi diluída (em 1:10) com tampão TE (pH 8,0) até obtenção de duas cópias de DNA/microlitro. Estas amostras foram mantidas a quatro graus até o momento do uso (por até aprox. um mês).

Para curva padrão, uma alíquota de cinco microlitros de cada concentração de DNA em duplicata foi usada no ensaio do PCR-RT quantitativo, como descrito em 3.2.4.3.

Os resultados obtidos foram transferidos para planilha Microsoft Office Excel e o valor C_t avaliado (3.2.3.1.3).

Figura 12. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de *Salmonella* em meio de cultura. RNeasy® = *Kit* para extração e purificação do RNA (Qiagen); DNeasy® = *Kit* para extração e purificação do DNA (Qiagen); LB = Luria-Bertani; Kan⁵⁰ = kanamicina (50 µg/mL concentração final).

3.3.1.2. Inoculação do caldo e coleta de amostras

Uma alíquota de 100 µL da cultura *overnight* de *S. Typhimurium* BB441 ou 51K61 (ambas em fase estacionária) em caldo LB foi inoculada em 100 mL de caldo LB. As culturas foram incubadas a 37 °C por 27 h com agitação (180 rpm) em *shaker*. O caldo para cepa BB441 foi suplementado com kanamicina 50 µg/mL (concentração final) (Sigma).

A população inicial foi determinada pela semeadura superficial, em triplicata, de diluições decimais sobre ágar LB e as placas incubadas a 37 °C por 24 h. As placas apresentando entre 20 e 200 colônias foram contadas e a média e o desvio padrão das populações obtidas nas triplicatas foram calculados.

Imediatamente após a inoculação do caldo LB (T_0) e a cada hora até seis horas de incubação (T_1 a T_6) e após 27 h (T_7), amostras de 400 µL foram retiradas e submetidas à extração e purificação do RNA, do DNA e também à enumeração da população viável por semeadura em ágar LB. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.3.1.3. Quantificação de *Salmonella* por semeadura em ágar

Uma alíquota de 100 µL de cada tempo de amostragem foi decimalmente diluída em solução estéril de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e diluições adequadas foram semeadas superficialmente, em triplicata, em ágar LB. As placas foram incubadas por 18-24 h e as populações estimadas pelo cálculo das médias das populações obtidas nas triplicatas.

3.3.1.4. Quantificação de *Salmonella* empregando PCR-RT

A extração e a purificação do DNA foram realizadas com o DNeasy® Blood & Tissue Kit, conforme descrito em 3.3.1.1. Uma alíquota de cinco microlitros do DNA eluído foi usada na PCR-RT e a quantificação de *Salmonella* foi realizada conforme descrito em 3.2.4.3. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

3.3.1.5. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT

A estabilização do RNA foi realizada usando o RNA Protect[®] Bacteria Reagent (Qiagen, 2005), sendo a sua extração e a sua purificação realizadas com o RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, 2006), de acordo com o protocolo do fabricante, mas com pequenas modificações. Para estabilizar o RNA, 800 µL de RNAprotect[®] Bacteria Reagent foram imediatamente adicionados aos 400 µL de amostra (3.3.1.2) e os tubos mantidos em gelo. Antes de iniciar a extração e a purificação, a mistura foi mantida por cinco minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 10 min a 5.000 x g. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de tampão TE [10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, (pH 8,0)] contendo quatro miligramas/mililitro de lisozima (Serva).

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 min a 100 rpm em um incubador com agitação (Eppendorf 5432, Alemanha) e periodicamente misturadas por *vortex* durante 10 s. Uma alíquota de 700 µL de tampão RLT contendo sete microlitros de β-mercaptoetanol (Merck) foi adicionada às amostras, que foram então centrifugadas por dois minutos a 20.000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga estéril e 500 µL de etanol p.a. (v/v) (Merck) foram adicionados à mistura, que foi homogeneizada com auxílio de pipeta.

Para a extração do RNA total do lisado bacteriano, a amostra preparada foi transferida para uma coluna do RNeasy[®] Mini *spin* colocada em um tubo coletor e centrifugada por 15 s a 8.000 x g. Para purificação do RNA, alíquota de 350 µL de tampão RW1 foi adicionada à coluna que foi centrifugada por 15 s a 8.000 x g. O eluído foi descartado.

A coluna foi tratada, para remoção do DNA remanescente, com 80 µL de solução de DNase I (10 µL de DNase + 70 µL de tampão RDD – Qiagen) e mantida à temperatura ambiente por 20 min. A seguir, 350 µL de tampão RW1 foram adicionados à coluna e, após manutenção à temperatura ambiente por 5 min, esta foi centrifugada por 15 s a 8.000 x g. A etapa de remoção do DNA foi repetida para assegurar a completa eliminação do mesmo. A coluna foi então transferida para um novo tubo coletor, lavada por duas vezes com 500 µL de tampão RPE e centrifugada, primeiramente, por 15 s e, a seguir, por dois minutos a 8.000 x g.

Uma nova centrifugação por um minuto a 20.000 x g foi realizada para garantir a remoção de etanol residual. A coluna foi colocada em um novo tubo

coletor e o RNA eluído pela adição de 50 µL de água isenta de RNase diretamente na coluna, com centrifugação por 1 min a 8.000 x g. Este processo foi repetido mais uma vez e o eluído contendo o RNA foi armazenado a -80 °C até o momento de uso, quando foi diluído 1:10 em água DEPC e submetido à reação RT-PCR-RT, conforme item 3.2.5.1.3.

3.3.1.6. Cálculo da viabilidade de *Salmonella*

A relação entre concentração de RNA (RT-PCR-RT) e de DNA (PCR-RT), que indica a viabilidade celular, foi obtida pela divisão do número de cópias do RNA pelo número de cópias do DNA. Os valores obtidos nas quantificações (3.3.1.5 e 3.3.1.4) foram transferidos para planilha Microsoft Office Excel, as funções de divisão, média, desvio padrão foram calculadas, a diluição do material genético corrigida e os valores ajustados para UFC eq por mililitro.

3.3.2. Avaliação em alimento-modelo

As amostras de alimentos-modelo preparadas conforme 3.1.3 foram avaliadas para presença/ausência de *Salmonella* endógena, de acordo com o método ISO 6579:2002 descrito a seguir:

Uma porção de um mililitro das amostras foi diluída em nove mililitros de água peptonada tamponada (Merck) e incubada a 37 °C por 16 a 20 h, sem agitação. Uma alíquota de 100 µL do pré-enriquecimento foi transferida para 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck) e incubada por 24 h a 42 °C. A seguir, semeou-se, em duplicata, sobre placas contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Oxoid, RU) e ágar BPLS (ágar verde brilhante vermelho-fenol lactose sacarose) (Merck) que foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h. Colônias suspeitas de *Salmonella* foram submetidas a testes de aglutinação em lâmina usando-se o soro polivalente anti-*Salmonella* (SIFIN, Alemanha).

3.3.2.1. Inoculação dos alimentos-modelo – população elevada de *Salmonella*

Na figura 13, encontra-se a representação esquemática deste estudo.

Porções de 10 mL de alimento-modelo ave e suíno foram inoculadas com cultivo *overnight* de *S. Typhimurium* (51K61) de modo a conter $4,7 \times 10^6$ UFC/mL. Após a contaminação, as amostras foram divididas em duas porções, sendo uma incubada à temperatura de 20 °C e a outra a 8 °C.

Imediatamente após a inoculação (T_0), após 3 h (T_1), 21 h (T_2), 45 h (T_3) e 165 h (T_4), alíquotas foram retiradas para análise e a semeadura realizada em duplicata.

3.3.2.1.1. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT

Foi realizada conforme descrito em 3.2.4.3.

3.3.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT

Foi realizada conforme descrito em 3.2.5.1.3.

3.3.2.1.3. Quantificação de *Salmonella* e da microbiota acompanhante por semeadura em ágar

Nos mesmos tempos empregados para quantificar por PCR-RT e por RT-PCR-RT e também após 333 h de inoculação (T_5), alíquotas de 100 µL foram retiradas para determinação da população de *Salmonella*, que foi conduzida conforme 3.3.1.3 em ágar XLD. A determinação da população de microrganismos mesófilos foi realizada pela semeadura superficial de 100 µL das amostras em ágar padrão (PCA). Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h.

Figura 13. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de *Salmonella* em alimento-modelo contendo população elevada de patógeno ($4,7 \times 10^6$ UFC/mL). RNeasy® = Kit para extração e purificação do RNA; DNeasy® = Kit para extração e purificação do DNA; XLD = ágar xilose lisine desoxicolato; PCA= ágar padrão para contagem; UFC = Unidade Formadora de Colônia.

3.3.3. Inoculação dos alimentos-modelo – população baixa de *Salmonella*

A representação esquemática deste estudo pode ser vista na Figura 14.

Porções de 35 mL de alimento-modelo ave e suíno foram inoculadas com cultivo *overnight* de *S. Typhimurium* (51K61) de modo a conter $5,3 \times 10^2$ UFC/mL. Imediatamente após a contaminação, as amostras foram divididas em três porções, sendo uma mantida à temperatura de 20 °C, outra a 8 °C e a terceira incubada a 4 °C.

Imediatamente após a inoculação (T_0), após 3 h (T_1), 6 h (T_2), 24 h (T_3), 72 h (T_4), 215 h (T_5) e 358 h (T_6), alíquotas foram retiradas e submetidas às determinações.

3.3.3.1. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT

Foi realizada conforme descrito em 3.2.4.3 para as porções mantidas a 20 °C e a 8 °C.

3.3.3.2. Avaliação da viabilidade celular por RT-PCR-RT

Foi realizada conforme descrito em 3.2.5.1.3 para as porções mantidas a 20 °C e a 8 °C.

3.3.3.3. Quantificação de *Salmonella* e da microbiota acompanhante por semeadura em ágar

Realizada conforme 3.3.2.1.3.

3.3.3.4. Cálculo da viabilidade de *Salmonella*

Foi realizado conforme 3.3.1.6.

3.3.4. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. Foram aplicados dois testes não paramétricos: o teste de Wilcoxon e o de Friedman. O primeiro teste aplica-se para analisar diferenças entre duas condições de um mesmo grupo. Já o teste de Friedman se aplica quando existem três ou mais condições de emparelhamento, no qual cada variável é classificada numa escala de nível, pelo menos ordinal. Para ambos os testes considerou-se o intervalo de significância de $p < 0,05$.

Figura 14. Representação esquemática da avaliação da RT-PCR-RT para quantificação de *Salmonella* em alimento-modelo contendo população baixa de patógeno (5.3×10^2 UFC/mL). RNeasy® = Kit para extração e purificação do RNA; DNeasy® = Kit para extração e purificação do DNA; XLD = ágar xilose lisine desoxicolato; PCA= ágar padrão para contagem; UFC = Unidade Formadora de Colônia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação quantitativa e qualitativa de *Salmonella* em amostras de fezes suínas pelo método clássico

Para a quantificação de *Salmonella*, empregou-se o método de semeadura na superfície de ágar XLD^{Nal50} utilizando o Spiral Plater WASP. Para este método, o limite de quantificação foi de 10^2 UFC/g. Em algumas situações empregou-se a semeadura superficial de alíquotas de 0,3, 0,3 e 0,4 mL da primeira diluição, sendo o limite de quantificação de 10 UFC/g. Se nenhuma colônia foi obtida tanto no ágar XLD^{Nal50} como no ágar MSRV o resultado foi interpretado como sendo zero (UFC/g) (Tabela 8). Por outro lado, quando no método qualitativo colônias eram evidenciadas, mas não no método de contagem em placa, considerou-se o resultado como sendo <10 UFC/g ou <10² UFC/g dependendo da situação.

Estes resultados foram utilizados para a avaliação da eficiência do método molecular proposto.

4.2. Desenvolvimento do ensaio para quantificação direta de *Salmonella* por PCR-RT empregando o gene *ttr*

Para a quantificação de *Salmonella* em amostras de fezes suínas por PCR-RT realizou-se uma etapa de tratamento da amostra pré-PCR para purificar o DNA microbiano diretamente do material fecal. Esta etapa foi seguida da amplificação de um fragmento do gene *ttr*, específico para *Salmonella*, empregando o par de *primers* *ttr*-6 e *ttr*-4 (Tabela 4). O *primer* *ttr*-6 está localizado internamente no gene *ttrC*, enquanto que o *primer* *ttr*-4 e a sonda *ttr*-5 estão localizados no gene *ttrA*, resultando em um produto de PCR de 95 pares de base (pb).

A quantificação do DNA de *Salmonella* nas amostras baseou-se no princípio da quantificação absoluta. Essa quantificação absoluta utiliza padrões a cada nova PCR-RT realizada. Inicialmente, uma curva padrão foi gerada com a utilização de populações conhecidas de *Salmonella* e, posteriormente, com DNA

Tabela 8. População média de *S. Typhimurium* (BB441) (UFC/g) obtida em fezes de suínos artificialmente contaminados.

Dias após infecção	Experimento I - 30/05/06 (UFC/g)				Dias após infecção	Experimento II - 25/07/06 (UFC/g)				Dias após infecção	Experimento III - 26/09/06 (UFC/g)		Dias após infecção	Experimento IV - 20/11/06 (UFC/g)		
	Animal 2	Animal 5	Animal 8	Animal 9		Animal 1	Animal 2	Animal 15	Animal 16		Animal 7	Animal 8		Animal 4	Animal 11	Animal 12
2	$4,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	3	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$	3	$5,0 \times 10^3$	$<10^2$	2	$2,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
3	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$1,0 \times 10^4$	4	<10	$1,1 \times 10^2$	<10	$1,0 \times 10^1$	4	$<10^2$	$<10^2$	3	$1,0 \times 10^3$	$<10^3$	$9,0 \times 10^3$
4	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	8	$1,0 \times 10^1$	<10	<10	<10	7	$4,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	4	$2,7 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$2,9 \times 10^3$
6	$<10^2$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$<10^2$	13	<10	0	<10	0	9	$5,0 \times 10^1$	$5,8 \times 10^2$	7	$5,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$
8	$<10^2$	$1,0 \times 10^2$	$<10^2$	$6,0 \times 10^2$	15	0 [□]	0	0	0	14	0	0	9	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
13	n.d. [▲]	$7,4 \times 10^2$	<10	$>10^4$	20	0	0	0	0	16	0	0				
15	$1,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$5,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	23	0	$4,0 \times 10^1$	0	0	21	0	0				
20	<10	$1,4 \times 10^2$	<10	-	28	0	<10	<10	<10	23	0	0				
22	<10	$1,9 \times 10^3$	<10	-						28	$8,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$				
28	<10	$1,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	-												

▲ não determinado devido à insuficiência de material fecal

- morte do animal

□ valor definido quando não se obteve colônias tanto pelo método quantitativo como qualitativo

extraído e purificado. O valor C_t obtido por PCR-RT para uma determinada concentração de células bacterianas foi comparado ao valor C_t obtido para a curva padrão e relacionado à concentração de DNA ou células. Este valor foi definido como UFC eq.

4.2.1. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando-se células íntegras

Na Figura 15 (A e B) observa-se o comportamento da curva padrão de *S. Typhimurium* (BB441) na PCR-RT empregando células diretamente (A) e DNA, após tratamento com o QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (B). O coeficiente de correlação linear foi de 0,9983 quando se empregaram as células diretamente e inclinação da reta foi de -3,455 (Figura 15A). Para a curva padrão empregando DNA após tratamento com QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit o coeficiente de correlação foi de 0,9994 e a inclinação de -3,4137 (Figura 15B). A inclinação das curvas padrão foi utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação (EA), que mostrou-se bastante elevada, sendo de 95% e de 96,3%, respectivamente, para células ou para DNA tratado com QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit.

Para populações bacterianas menores que 2 log UFC/mL (<2 log UFC eq) não foi possível a quantificação quando se empregaram células íntegras (Figura 15A). Já quando se empregou DNA purificado, a quantificação foi possível mesmo quando a população inicial era de aproximadamente 1 log UFC/mL (1 log UFC eq) (Figura 15B).

Comparando-se os resultados obtidos com as células íntegras com aqueles obtidos com o DNA extraído e purificado, verifica-se um comportamento semelhante, com queda no valor C_t diretamente proporcional ao aumento da população bacteriana.

A fim de verificar a estabilidade do material genético a ser utilizado, foram realizados estudos para a quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando alíquotas de células íntegras e de DNA pré-extraído, ambas submetidas a sucessivos congelamentos-descongelamentos. Verificou-se que o congelamento-descongelamento afetava a eficiência de amplificação (EA) da PCR-RT quando se empregaram células íntegras. Isto foi visualizado pela queda na EA das células

íntegras (dados não apresentados). Por esta razão, optou-se neste estudo pelo emprego de DNA previamente purificado e mantido congelado.

A.

B.

Figura 15. Curva padrão de *S. Typhimurium* (BB441) obtida por PCR-RT e gene *ttr* empregando células diretamente (A) e DNA após tratamento com o QIAamp® DNA Stool Mini Kit (B). EA = eficiência de amplificação.

Este efeito deletério do congelamento sobre o DNA molde de células íntegras também foi verificado por Moriya et al. (2006). Além disso, Malorny et al. (2008) relataram que o emprego de DNA genômico na quantificação bacteriana por PCR-RT gera resultados mais confiáveis que os obtidos com o emprego de células.

4.2.2. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT em fezes suínas naturalmente contaminadas

O total de 93 amostras de fezes foi coletado diretamente do reto de 13 suínos oralmente infectados com *S. Typhimurium* (BB441).

Na Tabela 9 encontram-se os valores médios de UFC eq de *Salmonella* e os C_t médios obtidos para as curvas padrão de fezes naturalmente contaminadas e submetidas ao PCR-RT, após tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

Tabela 9. Valores médios de UFC eq de *Salmonella* e C_t médios obtidos para as curvas padrão de fezes naturalmente contaminadas e submetidas ao PCR-RT, após tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

<i>Salmonella</i> (UFC/mL $\pm$ DP) [■]	<i>Salmonella</i> PCR-RT [UFC eq] [▲]	<i>Salmonella</i> (UFC eq) [○]	$C_t \pm DP^*$
$1,3 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5 \pm 6,1 \times 10^4$	$18,84 \pm 0,33$
$1,3 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$	$22,08 \pm 0,16$
$1,3 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$25,25 \pm 0,18$
$1,3 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^2$	$9,9 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$	$28,81 \pm 0,40$
$1,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$	$6,5 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2 \pm 2,9 \times 10^1$	$31,89 \pm 0,38$
$1,3 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^2$	$6,5 \times 10^0$	$9,6 \times 10^0 \pm 1,4 \times 10^0$	$35,43 \pm 0,59$
$1,3 \times 10^2 \pm 1,5 \times 10^1$	0,65	0,65	> 45

■ população de *Salmonella* obtida no ágar XLD^{Nal50} $\pm$ desvio padrão (DP)

▲ população de *Salmonella* em UFC eq definida na janela de detecção da PCR-RT

○ população de *Salmonella* em UFC eq obtida por PCR-RT

* C_t - ciclos da PCR cujo sinal fluorescente atingiu o limiar de detecção $\pm$ desvio padrão (DP)

A curva padrão média, referente a estas repetições está apresentada na Figura 16. Observa-se que o coeficiente de correlação linear foi igual a 0,9988 e a inclinação da curva padrão de -3,3302 (Figura 16). Verifica-se que o valor obtido para a inclinação da curva (-3,3302) está próximo ao valor teórico ideal (3,30) para PCR-RT, conforme definido pelo fabricante do equipamento. A EA foi de

99,6%. Isto demonstra que as alíquotas de DNA empregadas mantidas a -20 °C e periodicamente testadas permaneceram estáveis, revelando a viabilidade de uso.

As curvas referentes às diferentes repetições encontram-se no anexo I. Os resultados das repetições foram sempre muito semelhantes e as EA obtidas foram elevadas, variando entre 99,2% e 100% (Anexo I, A a D).

Figura 16. Curva padrão média obtida nas quatro quantificações independentes de DNA de *Salmonella* empregando a PCR-RT. EA = eficiência de amplificação.

Observa-se que a população de *Salmonella* definida na janela de detecção do equipamento para PCR-RT ($6,5 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^0$) (Tabela 9) apresenta, de maneira geral, equivalência com os valores UFC eq de *Salmonella* obtidos na PCR-RT (Tabela 9). O valor C_t médio para este limite de detecção foi de 35,43 (Tabela 9). O desvio padrão dos valores C_t médios foram obtidos pelos testes periódicos da avaliação da viabilidade do DNA mantido a -20 °C. Desta forma, o limite de detecção do patógeno foi de $6,5 \times 10^0$ UFC eq na PCR-RT, que corresponde um valor de 650 UFC eq/g de fezes suínas obtido após a correção pelo fator de diluição. Limite de detecção semelhante a este foi também obtido por Lund et al. (2006).

Na Tabela 9 encontram-se as populações (UFC eq/g) de *S. Typhimurium* (BB441) em fezes suínas naturalmente contaminadas determinadas por PCR-RT, após purificação do DNA bacteriano empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

A quantificação de *Salmonella* em amostras de fezes suínas pelo método clássico (Tabela 7) indicou populações menores que 10^2 UFC/g em 32 (34,4%) amostras do total (93) analisado. Em 22 (23,7%) das 93 amostras nenhuma colônia foi obtida tanto no ágar XLD^{NaI50} como no ágar MSRV. Com isto, o total de amostras com população de *Salmonella* abaixo do limite de detecção pelas metodologias tradicionais foi de 54.

Para a PCR-RT verificou-se que 53/93 (57%) amostras não puderam ser quantificadas (Tabela 10), indicando presença de <650 UFC eq/g de fezes.

Para facilitar a comparação destes dados, construiu-se a Figura 17 (A, B, C e D) empregando-se os dados das Tabelas 8 e 10. Nesta figura, pode-se avaliar os resultados médios obtidos nas enumerações realizadas para os quatro grupos de animais.

Observa-se que os resultados dos experimentos A, B e D, obtidos por ambos os métodos até o oitavo/nono dias pós-infecção, são muito semelhantes, o que é indicado pela baixa dispersão dos dados nos gráficos.

Analisando os dados das Tabelas 8 e 10, verifica-se que em 21 das 93 determinações (22,6%) o método PCR-RT gerou resultados superiores aos da metodologia por Spiral Plater. Por outro lado, em sete das 93 quantificações (7,5%) os resultados foram maiores com o método Spiral Plater que com a PCR-RT. Considerando somente os valores quantitativos exatos apresentados nas Tabelas 8 e 10, observa-se concordância entre ambos os métodos em 14 (15%) quantificações. Já em 10 (11%) ensaios, as quantificações apresentaram resultados discordantes entre as duas metodologias, assim como, não foi possível obter a exata população de *Salmonella* em 69 (74%) determinações.

Devido à insuficiência de material fecal, em alguns casos, a coleta de fezes foi realizada por *swab* e somente a população de *Salmonella* por método convencional foi determinada.

Fica claro que o método PCR-RT, baseado na amplificação do fragmento *ttr*, foi adequado e mostrou-se eficiente para estudos de quantificação de DNA de *Salmonella* em fezes, mesmo apresentando detecção superior ao método convencional (Spiral Plater). Entretanto, este limite de detecção deve ser melhorado para poder utilizá-lo com maior segurança em substituição ao método convencional.

Tabela 10. População média de *S. Typhimurium* (BB441) (UFC eq/g) determinado por PCR-RT após purificação do DNA bacteriano empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

Experimento I - 30/05/06 (UFC eq/g)					Experimento II - 25/07/06 (UFC eq/g)					Experimento III - 26/09/06 (UFC eq/g)			Experimento IV - 20/11/06 (UFC eq/g)			
Dias após infecção	Animal 2	Animal 5	Animal 8	Animal 9	Dias após infecção	Animal 1	Animal 2	Animal 15	Animal 16	Dias após infecção	Animal 7	Animal 8	Dias após infecção	Animal 4	Animal 11	Animal 12
2	1,9 x 10 ⁵	n.d. [▲]	1,3 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵	3	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	1,5 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	3	n.d.	8,9 x 10 ²	2	1,1 x 10 ⁴	6,8 x 10 ³	3,9 x 10 ³
3	2,9 x 10 ⁴	n.d.	1,8 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	4	<6,5 x 10 ²	8,3 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	4	8,9 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	3	8,3 x 10 ²	n.d.	n.d.
4	<6,5 x 10 ²	n.d.	1,1 x 10 ³	2,6 x 10 ⁴	8	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	7	9,2 x 10 ²	8,1 x 10 ²	4	2,0 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	n.d.
6	<6,5 x 10 ²	n.d.	<6,5 x 10 ²	7,8 x 10 ²	13	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	9	2,6 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	7	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	1,1 x 10 ³
8	<6,5 x 10 ²	n.d.	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	15	8,7 x 10 ²	7,4 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	14	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	9	1,9 x 10 ³	1,9 x 10 ³	<6,5 x 10 ²
13	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	20	7,6 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	16	7,9 x 10 ²	<6,5 x 10 ²				
15	<6,5 x 10 ²	1,2 x 10 ³	4,8 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	23	n.d. [▲]	1,6 x 10 ³	9,2 x 10 ²	8,2 x 10 ²	21	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²				
20	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	-	28	7,8 x 10 ²	2,1 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²	23	<6,5 x 10 ²	<6,5 x 10 ²				
22	<6,5 x 10 ²	7,4 x 10 ³	<6,5 x 10 ²	-						28	9,6 x 10 ³	<6,5 x 10 ²				
28	<6,5 x 10 ²	1,3 x 10 ⁶	<6,5 x 10 ²	-												

▲ não determinado devido à insuficiência de material fecal
- morte do animal

A.

B.

cont.

Figura 17. Quantificação pelo método clássico (UFC/g [log]) e PCR-RT (UFC eq/g [log]) de *Salmonella* em fezes suínas naturalmente contaminadas. A) experimento I, B) experimento II, C) experimento III e D) experimento IV. Símbolos fechados indicam análise por PCR-RT e símbolos vazados pelo método clássico - semeadura superficial com Spiral Plater (SP).

cont. fig. 17

C.

D.

Quantificação pelo método clássico (UFC/g [log]) e PCR-RT (UFC eq/g [log]) de *Salmonella* em fezes suínas naturalmente contaminadas. A) experimento I, B) experimento II, C) experimento III e D) experimento IV. Símbolos fechados indicam análise por PCR-RT e símbolos vazados pelo método clássico - semeadura superficial com Spiral Plater (SP).

Embora o método convencional baseado em Spiral Plater seja fácil e prático e sem necessitar de técnico com treinamento especializado, o tempo de incubação de 48 h necessário para obtenção de resultados confere-lhe uma desvantagem quando comparado à PCR-RT, que leva aproximadamente 4 h para realização do ensaio.

4.2.3. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando DNA purificado de *Salmonella* artificialmente inoculada em fezes suínas

Porções de fezes suínas isentas de *Salmonella* foram inoculadas com populações conhecidas de modo a conter entre 7,1 e 2,1 log/200 ± 20 mg fezes, em quadruplicata, e submetidas ao QIAamp® DNA Stool Mini Kit para a extração e purificação do DNA bacteriano.

4.2.3.1. Taxa de recuperação de DNA de *Salmonella* purificado empregando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit

Teoricamente, a quantificação direta de células de *Salmonella* por PCR-RT não está sujeita à perda do DNA genômico. Desta forma, é possível calcular a perda de DNA devido ao tratamento das amostras pelo emprego do QIAamp® DNA Stool Mini Kit. Esse cálculo foi baseado na taxa de recuperação, ou seja, a relação entre o UFC equivalente (UFC eq) obtido com a amostra artificialmente contaminada e submetida à extração empregando-se o QIAamp® DNA Stool Mini Kit (3.2.3.4) e o valor UFC eq obtido pelo emprego da cultura pura de *Salmonella* (3.2.3.1.2).

Na Tabela 11 encontra-se a taxa de recuperação de células de *S. Typhimurium* (BB441) artificialmente inoculada em fezes suínas e submetidas ao tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

Tabela 11. Taxa de recuperação de células de *S. Typhimurium* (BB441) artificialmente inoculada em fezes suínas e submetidas ao tratamento com QIAamp® DNA Stool Mini Kit.

<i>Salmonella</i> (UFC/mL ± DP)*	UFC eq cultura pura ± DP	C _t * cultura pura ± DP	UFC eq amostra tratada ± DP*	C _t amostra tratada ± DP	Taxa de recuperação em (% ± DP)
1,3 x 10 ⁸ ± 1,5 x 10 ⁷	9,3 x 10 ⁵ ± 6,1 x 10 ⁴	17,50 ± 0,10	2,3 x 10 ⁵ ± 1,5 x 10 ⁴	19,58 ± 0,10	25 ± 1,9
1,3 x 10 ⁷ ± 1,5 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁵ ± 2,6 x 10 ⁴	20,87 ± 0,38	2,7 x 10 ⁴ ± 2,1 x 10 ³	22,91 ± 0,12	25 ± 2,3
1,3 x 10 ⁶ ± 1,5 x 10 ⁵	8,0 x 10 ³ ± 1,7 x 10 ³	24,90 ± 0,35	3,4 x 10 ³ ± 5,4 x 10 ²	26,11 ± 0,26	43 ± 9,4
1,3 x 10 ⁵ ± 1,5 x 10 ⁴	9,9 x 10 ² ± 1,0 x 10 ²	28,12 ± 0,16	4,0 x 10 ² ± 5,0 x 10 ¹	29,43 ± 0,20	40 ± 5,8
1,3 x 10 ⁴ ± 1,5 x 10 ³	1,1 x 10 ² ± 2,9 x 10 ¹	31,51 ± 0,41	4,9 x 10 ¹ ± 9,0 x 10 ⁰	32,67 ± 0,26	44 ± 8,8
1,3 x 10 ³ ± 1,5 x 10 ²	9,6 x 10 ⁰ ± 1,4 x 10 ⁰	35,32 ± 0,23	4,8 x 10 ⁰ ± 4,0 x 10 ⁰	36,70 ± 1,34	50 ± 31,4
1,3 x 10 ² ± 1,5 x 10 ¹	0,9	> 45	-	> 45	-

* Unidade Formadora de Colônia (UFC) ± desvio padrão (DP)

* C_t - ciclo da PCR-RT cujo sinal fluorescente atingiu o limiar de detecção

* amostra submetida à extração e purificação com QIAamp® DNA Stool Mini Kit

A taxa de recuperação de DNA esteve entre 25%, quando se utilizaram níveis altos de contaminação com *Salmonella* (10⁵ UFC eq) e 50% para níveis baixos de contaminação (9,6 UFC eq) (Tabela 11). Apesar de a maior taxa de recuperação ter sido observada para 9,6 UFC eq, deve-se destacar que o desvio padrão associado a este valor foi elevado (Tabela 11), o que inviabiliza seu uso. Quando a população de *Salmonella* foi muito baixa (0,9 UFC eq) não ocorreu a amplificação, ficando o número de ciclos acima de 45.

O ensaio de PCR-RT empregado neste estudo foi validado baseado inicialmente na detecção do gene *ttr*, regulador da tetracionato redutase, empregando um par de *primers* descrito na literatura (Malorny et al., 2004). A seguir, utilizou-se como alvo o gene *tuf* e o conjunto de *primers*-sonda desenvolvidos neste estudo.

4.3. Desenvolvimento de um ensaio para quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando *tuf*

Uma vez que um dos objetivos do estudo era buscar um novo gene alvo para usar alternativamente no lugar do *ttr* para quantificação de *Salmonella* por PCR-RT, escolheu-se o *tuf* por ser um bom indicador de viabilidade celular (Sheridan et al., 1998). Além disso, o limite de detecção para a PCR-RT empregando *ttr* foi de 650 UFC eq/g (Tabela 9), limite este superior ao dos métodos convencionais que varia entre 10 e 100 UFC/g.

Foram então desenhados *primers* e sonda específicos para a quantificação e detecção do gene *tuf* de *Salmonella*.

Um dos problemas que se encontra quando se desenha *primers* e sondas é que pode ocorrer pareamento entre eles, o que interfere na obtenção de resultados.

Para garantir o pareamento da sonda no DNA alvo, deve-se estabelecer durante o processo de desenho que ela possua temperatura de *melting* entre 5 e 10 °C acima da dos *primers* (Lie e Petropoulos, 1998). Alguns dos programas que atualmente são empregados para o desenho de *primers* e de sondas já levam isto em consideração.

Usualmente, desenham-se vários conjuntos de *primers* que devem ser compatíveis com a sonda – e todos estes devem ser experimentalmente testados, de modo a definir qual o mais eficiente nas condições de ensaio.

Neste estudo, foram desenhados três conjuntos de *primers* e testados com a sonda *tuf*-MGB. O par *tuf*-5F e *tuf*-6R foi o que apresentou melhores resultados. Com este conjunto de *primers*-sonda obteve-se fluorescência >1 com um C_t <35,8, considerado ideal para a detecção do alvo.

A seguir, diversas cepas bacterianas (*Salmonella* sp. e outras espécies de microrganismos Gram-negativos) foram testadas quanto à especificidade dos *primers* e da sonda desenhados, empregando-se a PCR-RT.

4.3.1. Avaliação da PCR-RT quanto à inclusividade e à exclusividade empregando *tuf*

O par de *primers* *tuf*-5F/*tuf*-6R foi testado na PCR-RT em combinação com a sonda *tuf*-MGB. A localização e a seqüência exata do par de *primers* *tuf*-5F/*tuf*-6R e sonda *tuf*-MGB desenhados neste estudo podem ser encontradas em anexo (Anexos II, III e IV).

O total de 60 cepas bacterianas, sendo 30 cepas de *Salmonella* (Tabela 2) e 30 cepas de outras enterobactérias (Tabela 3), foi usado para testes de inclusividade e exclusividade.

Os resultados obtidos com a PCR-RT permitiram a identificação correta de todas as 30 cepas de *Salmonella*, o que significa uma inclusividade de 100% (Figura 18).

A exclusividade foi de 74%, uma vez que oito cepas (*Escherichia coli* O78:H4, *E. coli* O26:H11, *E. coli* K12, *Escherichia vulneris*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii* (5/95), *Shigella boydii* (EU-NS 38), *Shigella flexneri* 2a) apresentaram sinal fluorescente. Entretanto, estes sinais só foram observados com $C_t > 35,8$ (Figura 18), ou seja, acima do número de C_t considerado adequado para este tipo de ensaio.

Os resultados obtidos mostram que os *primers* e a sonda desenhados são eficientes para a detecção de *Salmonella* sp. por PCR-RT, mesmo se outras enterobactérias estiverem presentes.

Figura 18. Avaliação da exclusividade e inclusividade da PCR-RT empregando *tuf*, baseada na emissão de fluorescência (sinais FAM). Para identificação das cepas empregadas consultar Tabelas 1 e 2.

A PCR-RT surgiu como uma importante ferramenta para detecção e quantificação de patógenos bacterianos. O diagnóstico empregando a PCR-RT é extremamente eficiente, sendo um método com potencial para emprego em pesquisas de doenças infecciosas e genéticas (Rådström et al., 2004), em amostras

ambientais (Fey et al., 2004; Rådström et al., 2004) e para detecção de patógenos em indústrias de alimentos (Ellingson et al., 2004; Malorny et al., 2008).

Alguns testes comerciais empregando PCR-RT já estão disponíveis no mercado, mas são testes qualitativos. Entretanto, testes quantitativos, importantes para estimar a população de um patógeno em matrizes alimentícias com a finalidade de realizar a avaliação de risco, não estão ainda disponíveis. Este estudo foi realizado para desenvolver um teste que suprisse esta necessidade.

Uma vez que os alimentos são matrizes complexas, que podem conter inibidores da PCR e outros interferentes utilizou-se, numa primeira etapa desse estudo, amostras de fezes suínas por conterem interferentes importantes, tais como sais biliares e polissacarídeos complexos. Numa segunda fase, para verificar a possibilidade de interferentes presentes em alimentos afetarem a PCR, utilizou-se alimentos-modelo inoculados com *Salmonella*.

A revisão realizada por Wilson (1997) é bastante útil, pois apresenta uma lista de inibidores da PCR e os mecanismos pelos quais estes inibidores podem atuar.

Um dos pontos fundamentais quando se realiza uma PCR-RT é a qualidade e a pureza do DNA a ser amplificado. Existem diversos *kits* no mercado que permitem a extração de DNA de matrizes complexas como as fezes. O *kit* escolhido para ser avaliado neste estudo foi o QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit.

A vantagem do emprego deste *kit* é que ele possui uma etapa de pré-tratamento das amostras com um agente inibidor de interferentes da PCR comumente presentes nas fezes (Qiagen, 2007). A seguir, as amostras são submetidas à extração e purificação do DNA bacteriano.

Observou-se que o pré-tratamento foi muito eficiente, gerando DNA livre de inibidores e de boa qualidade. Isto pode ser verificado quando se compara os resultados obtidos para PCR-RT empregando DNA proveniente da cultura pura com o das amostras de fezes artificialmente inoculadas com *Salmonella* e submetidas à purificação com o *kit* (Tabela 11), bem como com as amostras naturalmente contaminadas.

Além disso, o DNA preparado mostrou-se estável a sucessivos processos de congelamento-descongelamento, sem afetar a possibilidade de sua utilização.

Métodos que permitam a obtenção de DNA de qualidade e em quantidade adequadas para realização da PCR-RT têm sido bastante discutidos. Rådström et al. (2004) apresentam uma revisão sobre as diferentes estratégias pré-PCR a serem empregadas. Estes autores destacam a importância de se eliminar os inibidores antes da realização da PCR, tornando a amostra passível de amplificação. Dentre os principais inibidores de PCR, os pesquisadores destacam sais biliares e polissacarídeos complexos das fezes, colágeno e polissacarídeos nas amostras de alimentos, polissacarídeos em plantas, entre outros.

Alguns estudos comparando a eficiência do QIAamp® DNA Stool Mini Kit com outros *kits* comerciais ou métodos desenvolvidos nos laboratórios para extração e purificação de DNA a partir de espécimes humanas ou animais têm sido publicados.

McOrist et al. (2002) avaliaram cinco métodos para a extração de DNA bacteriano de fezes humanas e verificaram que o QIAamp® DNA Stool Mini Kit foi o método de extração mais eficiente. Empregando este *kit* os autores conseguiram a detecção dos DNA-alvo já com PCR primários, em uma ampla variação de concentrações de microrganismos inoculadas nas fezes.

Vandenberg e van Oorschot (2002) empregaram o QIAamp® DNA Stool Mini Kit para extrair DNA nuclear humano de fezes, para então submetê-lo à PCR. Eles verificaram que o DNA extraído de várias quantidades de fezes, e de fezes expostas a diferentes condições ambientais, pode ser amplificado com sucesso.

Johnson et al. (2005), também avaliando a extração de DNA nuclear humano de amostras de fezes, compararam o desempenho do QIAamp® DNA Stool Mini Kit com o do método padrão de extração de DNA empregando fenol-clorofórmio. Eles relatam que, empregando o *kit*, foi possível obter maior rendimento na extração, além de obter amostras de DNA de um número maior de espécimes analisadas. Segundo os autores, esta vantagem pode ser decorrente do emprego de tampão ASL na etapa de lise, além do tablete de InhibitEX, cuja composição não é revelada pelos fabricantes.

Em desacordo com os resultados anteriores está o estudo de Yu e Morrison (2004) que, comparando dois métodos comerciais de extração de DNA bacteriano (QIAamp® DNA Stool Mini Kit e FastDNA SPIN Kit) de amostras fecais e de digesta de bovinos com métodos não comerciais, obtiveram rendimento de DNA inferior com os *kits* comerciais.

Li et al. (2003) compararam o QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit com o método *bead beating* para extração de DNA bacteriano de amostras de íleo, ceco e cólon de suínos. Os pesquisadores verificaram que ambos os métodos foram eficientes na obtenção de DNA de boa qualidade e concluíram que o *kit* é apropriado para estudos com microrganismos, principalmente por ser de fácil uso e permitir o processamento de múltiplas amostras. O mesmo foi verificado por Flekna et al. (2007).

Apesar da qualidade do DNA extraído ter sido boa há, segundo Malorny et al. (2008), a necessidade de se determinar a taxa de recuperação do DNA. Para tanto, matriz livre do microrganismo alvo deve ser contaminada com suspensão bacteriana de população conhecida e submetida à extração e purificação, seguida da PCR-RT. Como controle emprega-se na PCR-RT as mesmas diluições do microrganismo alvo e os valores C_t obtidos são comparados. A taxa de recuperação é determinada pela relação entre o UFC eq obtido com a amostra artificialmente contaminada e o UFC eq da amostra controle.

A taxa de recuperação encontrada neste estudo foi inversamente proporcional à concentração de DNA, conforme pode ser verificado na Tabela 11. Este comportamento foi também observado por Josefsen et al. (2007), que obtiveram maior perda quando submeteram à extração concentrações mais elevadas de DNA.

Taxa de recuperação de DNA de aproximadamente 50% também foi descrita por Schuurman et al. (2005) para DNA viral.

Neste estudo, observou-se que os valores obtidos pela quantificação direta por PCR-RT, tanto para cultivos submetidos à purificação com QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit como não, foram sempre inferiores aos valores obtidos pela semeadura em placa (Tabela 11). Estes resultados são contrários aos relatados por Wolffs et al. (2005b), que obtiveram valores com a PCR-RT até dez vezes superiores aos obtidos pela técnica convencional. Estes autores relacionam estes resultados à detecção de células mortas.

São poucos os estudos encontrados na literatura empregando a PCR-RT para a detecção ou quantificação de microrganismos em fezes ou outras amostras de origem animal.

Lund et al. (2004) desenvolveram um ensaio PCR-RT para detecção de *Campylobacter* spp. diretamente em fezes de aves. Eles relatam que o limite de detecção do método foi de 100 – 150 UFC/mL de suspensão fecal e que o desempenho do método não foi estatisticamente diferente daquele baseado em enriquecimento seletivo.

Para enumerar as populações de *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* e microrganismos mesófilos totais em fezes de cães, Fu e colaboradores (2006) empregaram um método baseado na PCR-RT. Eles verificaram que houve correlação entre os resultados obtidos com a PCR-RT e os métodos tradicionais para *Lactobacillus* e microrganismos mesófilos totais, mas não para *Clostridium perfringens*, indicando que o protocolo empregado não foi adequado.

Robbins et al. (2007) compararam a eficiência de uma PCR-RT baseada no gene *bla* com a técnica de NMP para quantificar *Salmonella* Typhimurium DT 104 em fezes suínas. Os autores verificaram que os resultados obtidos com ambos os métodos foram equivalentes. Entretanto, os autores afirmam que apesar da faixa de detecção da PCR-RT ser mais ampla ($<1,0 \times 10^3 - 2,7 \times 10^7$ cópias DNA/g) que a técnica de NMP ($<0,3 - >110$ UFC/g), seu limite inferior ainda é alto e precisa ser melhorado.

Schuurman et al. (2007), empregando um método de PCR-RT para detecção de *Salmonella* e *Campylobacter* em amostras de fezes humanas, verificaram aumento de 15% a 18% na positividade para ambos os patógenos quando comparado à metodologia convencional.

Também são poucos os estudos publicados empregando a PCR-RT na detecção e/ou quantificação de patógenos em alimentos tanto naturalmente quanto artificialmente contaminados.

Um dos trabalhos pioneiros de detecção de *Salmonella* empregando a PCR-RT em alimentos envolvidos em um surto foi conduzido por Daum et al. (2002) nos Estados Unidos. Comparando o método baseado em cultura com a PCR-RT, empregando uma sonda gene-específica (*invA*) marcada com corante fluorescente (TaqMan), os autores verificaram que os resultados foram equivalentes. Eles destacam que a PCR-RT permitiu detecção de *Salmonella* em menos de 3 h, o que

é extremamente vantajoso, quer para autoridades de saúde pública, quer para indústrias.

Eyigor et al. (2002) avaliaram a eficiência da PCR-RT para detectar *Salmonella* a partir do enriquecimento de amostras de intestinos de aves em caldo tetracionato. Eles verificaram que a PCR-RT, como empregada, foi muito eficiente na detecção de *Salmonella* em lotes infectados, pois permitiu a obtenção de resultados mais rapidamente. Entretanto, os autores sugerem que a confirmação bacteriológica seja realizada.

Seo et al. (2004) desenvolveram um ensaio empregando PCR-RT para detecção de *Salmonella* Enteritidis artificialmente inoculada em ovos, empregando uma sonda gene-específica (*sefA*) marcada com o sistema TaqMan. Os autores verificaram que o ensaio apresentou 100% de correlação com o método convencional de cultivo, além de apresentar potencial para ser usado na enumeração de pequenas populações do patógeno.

Um procedimento cujo alvo foi o locus *ttrRSBCA* foi desenvolvido e validado por Malorny et al. (2004) empregando sonda TaqMan para detecção de *Salmonella* sp. em alimentos natural ou artificialmente contaminados. Os autores verificaram que o método proposto apresentou 100% de correlação com os resultados obtidos com cultivo convencional, com a vantagem de levar apenas 24 h.

A comparação entre PCR-ELISA, PCR-RT empregando o LightCycler e método convencional (ISO 6579) para detectar *Salmonella* spp. em leite e carnes foi realizada por Perelle et al. (2004). O alvo foi, para as duas PCR, o gene *invA* e amostras de alimento artificialmente contaminadas, bem como naturalmente contaminadas foram empregadas. Os autores verificaram que ambos os métodos apresentaram desempenho semelhante ao método convencional. Entretanto, destacaram que a PCR-RT é mais fácil e rápida de executar, permitindo a obtenção do resultado em 1,5 h contra 6 h da PCR-ELISA, além de apresentar menor risco de contaminação. Como desvantagem da PCR-RT destacam os custos do equipamento de amplificação e o emprego de sonda fluorescente para a detecção do alvo.

Ellingson et al. (2004) propuseram um procedimento para a detecção, em 12 h, de *Salmonella* em produtos cárneos crus ou prontos para consumo. Após o enriquecimento, por 6 h, das amostras artificialmente contaminadas, o DNA total foi

extraído e usado como molde na PCR-RT utilizando o LightCycler, empregando *primers* gênero-específicos (*sipB* e *sepC*) e sonda fluorescente também específica. Os resultados obtidos apresentaram 100% de correlação com o teste de imunoprecipitação visual e com a cultura convencional.

Um método empregando como alvo o gene *invA*, a sonda SYBR Green e o sistema LightCycler foram comparados com o convencional (USDA) por Eyigor et al. (2005) para detectar *Salmonella* em amostras de aves. Os resultados revelaram que o método alternativo foi superior ao convencional, sendo que sua elevada taxa de detecção, segundo os pesquisadores, se deve à presença nas amostras naturalmente contaminadas de *Salmonella* com perfis bioquímicos atípicos, além da possibilidade das células bacterianas estarem na fase viável não-cultivável.

A avaliação do uso da PCR-RT para detectar *Salmonella* inoculada em filés de peito de frango submetidos a processamento por pressão hidrodinâmica foi realizada por Patel et al. (2006). O alvo foi o gene *iagA* e a detecção ocorreu através da sonda fluorogênica molecular beacon. Eles destacam que *Salmonella* com perfis bioquímicos atípicos, que podem não ser detectados pelo método convencional de cultivo (USDA), o podem pela PCR-RT, assim como células letalmente injuriadas que não possam ser cultivadas.

Um método PCR-RT para detecção de *Salmonella* Enteritidis e confirmação da presença de *Salmonella* sp. em água de enxágüe de carcaças de frangos e em ovos foi desenvolvido por Malorny et al. (2007). O ensaio teve como alvos os genes *Prot6e*, localizado em um plasmídeo de virulência de *S. Enteritidis*, e o gene *invA* (*Salmonella* sp.), empregando sonda TaqMan. Eles relatam que o ensaio apresentou 100% de precisão, sensibilidade e especificidade quando amostras naturalmente contaminadas foram testadas. Outra característica do método é o curto tempo para obtenção dos resultados – 24 h contra 5 a 6 dias para o método convencional.

Além dos trabalhos anteriormente citados, outros empregando a PCR-RT para a detecção de outros microrganismos também podem ser encontrados (Josefsen et al., 2004; O'Grady et al., 2008; Sails et al., 2003).

Com relação a enumeração de microrganismos em alimentos empregando a PCR-RT, verificou-se que metade dos trabalhos encontrados estão relacionados à enumeração de *Salmonella*.

Um dos primeiros estudos de quantificação de *Salmonella* empregando PCR-RT foi realizado por Jung et al. (2005). Estes pesquisadores desenvolveram um método cujo alvo foi o *invA* e empregaram uma sonda TaqMan-MGB. O limite de detecção para amostras artificialmente contaminadas foi de 10^3 cópias de DNA/mL, tendo o método apresentado sensibilidade semelhante à do método convencional de enumeração. Observou-se, no entanto, que o número de cópias de DNA foi de uma a duas vezes superior ao obtido com a semeadura em ágar.

Seo et al. (2006) descreveram um método para quantificação de *S. Enteritidis* em sorvete associado a surto e o compararam com a enumeração empregando a técnica do NMP e à de semeadura em ágar seletivo. Os autores relatam que as populações de *S. Enteritidis* derivadas da PCR-RT foram aproximadamente 1 log superior às obtidas tanto com a semeadura em ágar como com o NMP. Eles verificaram ainda que ao PCR-RT proposto faltava sensibilidade, ficando o limite de detecção ao redor de 10^3 cópias de DNA/g de sorvete (ou 10^3 UFC/g).

Wolffs et al. (2006) desenvolveram um protocolo para quantificação e detecção direta de *Salmonella* em água de enxágüe de frango e de uso em broto de feijão. O protocolo baseou-se na detecção do gene *invA* e emprego de SYBR Green I. Com este método, o limite de detecção verificado foi de $\geq 7,5 \times 10^2$ UFC/100 mL. Eles destacaram ainda que o tempo de duração da análise desde a filtração até o final da quantificação foi de aproximadamente três horas, o que representa grande economia de tempo se comparado à metodologia convencional.

Um método PCR-RT multiplex para quantificação direta de *Salmonella* spp., coliformes, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* em amostras de swab de carcaças de suínos, de bovinos e de amostras ambientais de abatedouro foi desenvolvido por Guy et al. (2006). A detecção de *Salmonella* spp. baseou-se no gene *invA*, no *lacZ* para coliformes, no *eaeA* para *E. coli* O157:H7, no *hly* para *L. monocytogenes* e no emprego do corante marcador ROX. Comparando o método rápido com o tradicional, eles verificaram que as populações encontradas pelo método alternativo foram de 2 a 50 vezes superiores ao método de semeadura em placa. Eles atribuem este aumento à detecção da bactéria nos três estados fisiológicos (vivas, mortas e viáveis não-cultiváveis). Quando os autores trataram as amostras com EMA (etídeo-monoazida), corante que previne a amplificação do DNA de bactérias com paredes danificadas, não houve diferença estatisticamente

significativa entre os resultados obtidos com a PCR-RT e o método de semeadura em placa.

Para concentrar as células alvo e simultaneamente minimizar os efeitos das substâncias inibidoras da PCR, da microbiota acompanhante e de partículas de alimentos, além de reduzir resultados falso-positivos, Wolffs et al. (2007) propuseram um método que combina *flotation* com PCR-RT para a quantificação simultânea de *Salmonella* e *Campylobacter* em água de lavagem de carcaças de aves. Na PCR-RT o alvo foi o gene *invA*, para *Salmonella*, e uma sequência do 16 rRNA, para *Campylobacter*, empregando-se o sistema LightCycler. O limite de quantificação do método foi de $3,0 \times 10^3$ UFC/mL para ambos os patógenos, mesmo em presença de populações elevadas (10^9 UFC/mL) de outros microrganismos.

A comparação dos resultados deste estudo com os da literatura foi feita junto com os resultados apresentados a seguir para RT-PCR-RT.

4.4. Desenvolvimento do ensaio baseado no gene *tuf* para quantificação de *Salmonella* sp. por RT-PCR-RT

4.4.1. Curva padrão de quantificação do DNA de *S. Typhimurium*

Para quantificação absoluta do DNA de *Salmonella* uma curva padrão foi estabelecida usando diluições decimais seriais de DNA extraído de *S. Typhimurium* (BB441). Conforme pode ser verificado, na figura 19, o coeficiente de correlação linear foi de 0,9922 e a inclinação da curva padrão de -3,486. A EA da PCR-RT empregando como alvo *tuf* foi de 94% e o valor C_t de 36 foi determinado como sendo o limite de detecção (Tabela 12). Este limite permite detecção menor que 1 log UFC eq.

Esta curva permite a quantificação de DNA numa faixa de variação de 6 ciclos logarítmicos. O limite de detecção obtido neste estudo para PCR-RT foi superior ao relatado por outros pesquisadores (Jung et al., 2005; Lund et al., 2004; Robbins et al., 2007; Seo et al., 2006; Wolffs et al., 2006). Este melhor resultado pode ser decorrente tanto da escolha de um gene mais adequado, quanto do protocolo desenvolvido, ou da combinação dos dois fatores.

Tabela 12. Valores C_t médios obtidos por PCR-RT para *tuf* empregando-se diferentes concentrações de DNA de *S. Typhimurium* (BB441).

<i>Salmonella</i> BB441	
Concentração de DNA (log ₁₀)	($C_t \pm DP$) [■]
6	16,0 ± 0,26
5	20,0 ± 0,20
4	23,9 ± 0,51
3	27,7 ± 0,38
2	31,2 ± 0,37
1	34,3 ± 0,80
0,1	36,1 ± 0,00

■ valores C_t médios obtidos na PCR-RT com *tuf* como alvo ± desvio padrão (DP)

Figura 19. Curva padrão obtida por PCR-RT usando diferentes concentrações de DNA de *S. Typhimurium* (BB441) e *primers* para *tuf*.

4.4.2. Curva padrão do *tuf*-RNA

O *tuf*-RNA foi sintetizado *in vitro* (3.2.5.1.2) e diluído decimalmente para quantificação absoluta na RT-PCR-RT. Os *primers* para a PCR permitiram a amplificação, conforme esperado, um fragmento de 974 pb do gene *tuf*.

Os resultados indicaram que as curvas padrão foram lineares para ambas as cepas (Figura 20 A e B), com inclinação da curva padrão de -3,3962, para a cepa BB441, e de -3,3138, para 51K61. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9981, para a cepa BB441, e de 0,9994, para a 51K61. A EA da RT-PCR-RT foi de 97%, para BB441, e de 100%, para 51K61. O desvio padrão dos valores C_t foi maior para a cepa BB441 (desvio padrão >1,0) do que para a cepa 51K61 (Tabela 13). O valor C_t de 37 foi determinado como sendo o limite de detecção (Tabela 13). Este limite permite detectar até dois logaritmos UFC eq.

Conforme já havia sido observado para a curva padrão de quantificação de DNA, a curva padrão preparada para quantificação de RNA é bastante ampla e apresentou possibilidade de ser usada numa faixa de variação de até sete logaritmos.

Estes resultados também permitem que se afirme que a sonda *tuf*-MGB desenhada para este estudo foi bastante eficiente.

Tabela 13. Valores C_t médios obtidos por RT-PCR-RT para diferentes concentrações de RNA de *S. Typhimurium* (BB441 e 51K61).

Concentração de RNA (log ₁₀)	Valores C_t médios $\pm$ DP*	
	<i>Salmonella</i> BB441	<i>Salmonella</i> 51K61
9	14,3 $\pm$ 1,11	13,9 $\pm$ 0,59
8	17,8 $\pm$ 1,34	17,5 $\pm$ 0,75
7	21,1 $\pm$ 1,33	20,7 $\pm$ 0,72
6	24,6 $\pm$ 1,23	24,1 $\pm$ 0,56
5	28,0 $\pm$ 1,33	27,5 $\pm$ 0,62
4	31,0 $\pm$ 1,06	30,6 $\pm$ 0,57
3	35,5 $\pm$ 2,10	34,2 $\pm$ 0,29
2	37,7 $\pm$ 0,24	36,9 $\pm$ 0,67

*DP = desvio padrão

4.4.3. Avaliação da estabilidade do RNA transcrito *in vitro*

O RNA transcrito *in vitro* é muito suscetível à degradação portanto sua estabilidade deve ser assegurada. Para avaliar a estabilidade do *tuf*-RNA, empregou-se neste estudo o tampão RSB modificado do descrito por Hoffmann et al. (2006), segundo recomendações do próprio autor (Hoffmann, comunicação pessoal). Em paralelo, utilizou-se água livre de RNase. Periodicamente, alíquotas com três concentrações de *tuf*-RNA armazenado foram preparadas e submetidas à RT-PCR-RT.

A.

B.

Figura 20. Curva padrão obtida por RT-PCR-RT usando diferentes concentrações de RNA de *S. Typhimurium* BB441 (A) e 51K61 (B).

Na Tabela 14, encontram-se os resultados obtidos (C_t médios e os desvios padrão) para diferentes concentração de *tuf*-RNA mantido em tampão RSB modificado ou água livre de RNase.

Tabela 14. Valores C_t médios para diferentes concentrações de *tuf*-RNA mantido em tampão RSB modificado ou água livre de RNase.

Concentração de <i>tuf</i> -RNA	Diluyente	
	RSB modificado ($C_t \pm DP$) [♦]	H ₂ O livre de RNase ($C_t \pm DP$)
$1,0 \times 10^6$	$26,3 \pm 2,12$	$26,4 \pm 1,72$
$1,0 \times 10^4$	$32,4 \pm 2,03$	$33,6 \pm 1,75$
$1,0 \times 10^2$	$36,9 \pm 1,53$	$37,3 \pm 0,54$

♦ valores C_t médios de quatro repetições independentes, em duplicata $\pm$ desvio padrão (DP)

Pode-se observar na Tabela 14 que os C_t médios obtidos com os dois diluentes são próximos para uma mesma concentração, entretanto o desvio padrão encontrado foi maior quando se empregou o tampão RSB modificado do que a água livre de RNase. O desvio padrão foi maior para as amostras com maior concentração de *tuf*-RNA independentemente do diluyente.

Avaliando a estabilidade do *tuf*-RNA, após sucessivos congelamentos e descongelamentos, verifica-se que ocorre degradação no produto (Tabela 15). Esta degradação é indicada pelo aumento no valor C_t entre o primeiro e o quarto dia, o que evidencia a pouca estabilidade do *tuf*-RNA em ambos os diluentes.

Os resultados indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros avaliados (concentração de *tuf*-RNA, diluyente e dias de estocagem). Isto permite que se use a água livre de RNase para a manutenção de RNA transcrito.

Os dados obtidos neste estudo foram diferentes dos obtidos por Hoffmann et al. (2006), que relataram a estabilidade do RNA transcrito, suspenso em RSB, mesmo após sucessivos processos de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento.

Tabela 15. Avaliação da influência do diluente na estabilidade de *tuf*-RNA submetido a sucessivos processos de congelamento-descongelamento.

Dias	RSB modificado			H ₂ O livre de RNase		
	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ⁶ (C _t)	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ⁴ (C _t)	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ² (C _t)	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ⁶ (C _t)	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ⁴ (C _t)	<i>tuf</i> -RNA 1,0 x 10 ² (C _t)
1	23,0	29,4	35,6	24,0	31,0	37,1
2	27,0	32,3	37,2	26,2	33,7	38,1
3	27,2	33,5	38,9	27,3	34,3	-
4	27,9	34,4	-	28,3	35,4	37,0

- sem sinal fluorescente na RT-PCR-PCR

4.5. Avaliação dos métodos PCR-RT e RT-PCR-RT para quantificação de *Salmonella* empregando *tuf*

4.5.1. Avaliação em meio de cultura

Este experimento foi realizado para avaliar a eficiência dos métodos PCR-RT e RT-PCR-RT na quantificação de *Salmonella*, ambos empregando *tuf* como alvo.

A. Enumeração da população viável por semeadura em ágar

A população de *Salmonella* inoculada no caldo LB no T₀ foi de $4,2 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^5$ UFC/mL, para a cepa BB441, e $2,4 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$ UFC/mL, para a cepa 51K61. Após 27 h de inoculação (T₇), a população de *Salmonella* foi de $6,4 \times 10^9 \pm 6,0 \times 10^8$ UFC/mL, para BB441, e $4,4 \times 10^9 \pm 7,4 \times 10^8$ UFC/mL, para 51K61 (Tabela 15). A cepa 51K61 apresentou tempo de geração menor se comparada à cepa BB441. Isto pode ser observado nas quatro horas iniciais de incubação nas quais a população desta última esteve um logaritmo menor do que a cepa 51K61 (Tabela 16).

Tabela 16. População média de *S. Typhimurium* (BB441 e 51K61) obtida por semeadura em ágar Luria-Bertani em diferentes tempos de incubação a 37 °C.

Tempo (h) [■]	<i>Salmonella</i> BB441 (UFC/mL ± DP) [▲]	<i>Salmonella</i> 51K61 (UFC/mL ± DP)
T ₀ (0)	4,2 x 10 ⁶ ± 4,0 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁶ ± 1,5 x 10 ⁵
T ₁ (1)	3,9 x 10 ⁶ ± 5,8 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁶ ± 5,0 x 10 ⁵
T ₂ (2)	9,9 x 10 ⁶ ± 1,1 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁷ ± 5,2 x 10 ⁶
T ₃ (3)	5,5 x 10 ⁷ ± 1,7 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁸ ± 5,5 x 10 ⁷
T ₄ (4)	7,1 x 10 ⁸ ± 1,1 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁹ ± 1,2 x 10 ⁸
T ₅ (5)	3,4 x 10 ⁹ ± 7,9 x 10 ⁸	4,7 x 10 ⁹ ± 6,7 x 10 ⁸
T ₆ (6)	8,3 x 10 ⁹ ± 6,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ¹⁰ ± 1,2 x 10 ⁹
T ₇ (27)	6,4 x 10 ⁹ ± 6,0 x 10 ⁸	4,4 x 10 ⁹ ± 7,4 x 10 ⁸

■ intervalo de tempo entre amostragens

▲ Unidade Formadora de Colônia (UFC) ± desvio padrão (DP)

B. Quantificação de *Salmonella* por PCR-RT

Na Tabela 17, encontram-se os valores médios de UFC eq obtidos quando se realizou a PCR-RT empregando-se como alvo o gene *tuf*. Observa-se que o aumento em UFC eq obtido nos diferentes tempos de análise não estão acompanhados pela diminuição nos valores C_t.

O coeficiente de correlação linear foi de 0,04 para a cepa BB441, com inclinação da curva de 0,298, e de 0,024 para a cepa 51K61, com inclinação da curva de 0,265 (Anexo V, A e B).

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar estes resultados. A primeira está relacionada a falhas que podem ter ocorrido durante o preparo das várias diluições sucessivas. Como o volume de material a ser diluído é muito pequeno, isto pode ter ocasionado estes erros. A segunda hipótese está relacionada à curva padrão estabelecida (Figura 19), que abrange uma faixa de concentração de DNA variando entre menor que um logaritmo e seis logaritmos. Como as populações de *Salmonella* utilizadas neste experimento ficaram acima de 10⁶ UFC/mL

(Tabela 16) desde o T_0 , a concentração de DNA submetida à PCR-RT estava sempre acima da faixa de detecção da curva padrão. Com isto, a extrapolação dos valores pode ter ocasionado o erro.

Tabela 17. Valores médios de UFC eq e respectivos C_t de *S. Typhimurium* determinados por PCR-RT empregando *tuf*.

Tempo (h) [■]	<i>Salmonella</i> BB441		<i>Salmonella</i> 51K61	
	(UFC eq/mL $\pm$ DP [▲])	$C_t^* \pm$ DP	(UFC eq/mL $\pm$ DP)	$C_t \pm$ DP
T_0 (0)	$2,2 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^4$	$20,1 \pm 0,38$	$1,7 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$	$20,5 \pm 0,16$
T_1 (1)	$5,4 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^4$	$18,7 \pm 0,14$	$7,3 \times 10^5 \pm 5,0 \times 10^4$	$18,2 \pm 0,11$
T_2 (2)	$6,6 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$	$21,9 \pm 0,46$	$6,7 \times 10^6 \pm 6,1 \times 10^5$	$18,3 \pm 0,14$
T_3 (3)	$2,0 \times 10^7 \pm 4,1 \times 10^6$	$20,2 \pm 0,30$	$3,3 \times 10^7 \pm 6,5 \times 10^6$	$19,5 \pm 0,31$
T_4 (4)	$4,9 \times 10^7 \pm 2,5 \times 10^7$	$19,0 \pm 0,81$	$1,6 \times 10^8 \pm 5,2 \times 10^7$	$17,0 \pm 0,47$
T_5 (5)	$1,8 \times 10^8 \pm 5,0 \times 10^7$	$16,8 \pm 0,45$	$1,9 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^7$	$16,7 \pm 0,25$
T_6 (6)	$4,0 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$	$22,8 \pm 0,58$	$3,6 \times 10^8 \pm 4,7 \times 10^7$	$22,9 \pm 0,20$
T_7 (27)	$8,7 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$	$21,5 \pm 0,23$	$7,1 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$	$21,8 \pm 0,31$

■ intervalo de tempo entre amostragens;

▲ Unidade Formadora de Colônia equivalente (UFC eq) $\pm$ desvio padrão (DP)

* valores C_t médios obtidos por PCR-RT $\pm$ desvio padrão (DP)

Comparando-se os resultados obtidos para quantificação de *Salmonella* por PCR-RT empregando-se *ttr* e *tuf*, verifica-se que para este último a sensibilidade do método proposto é bem maior, indicada pelo limite de detecção encontrado (0,1 UFC eq para *tuf* e 650 UFC eq para *ttr*).

C. Avaliação da viabilidade celular de *Salmonella* empregando RT-PCR-RT

Na Tabela 18, encontram-se os valores médios da UFC eq obtidos com a RT-PCR-RT para as cepas BB441 e 51K61. O aumento em UFC eq é acompanhado pela diminuição de C_t por até cinco horas de incubação, para a cepa BB441, e por até três horas, para a 51K61, com coeficiente de correlação linear de 0,999, para ambas as cepas, e inclinação da reta de -3,436, para a cepa BB441, e de -3,296, para a 51K61 (Anexo VI, A e B). As equações de regressão indicam a linearidade dos resultados. A EA variou de 95,5% a 99,7%.

Observa-se nas Figuras 21 e 22 que *tuf* é expresso durante a fase logarítmica de multiplicação de *Salmonella*, ou seja, para BB441 o número máximo de cópias foi obtido entre 4-5 h após a inoculação e para 51K61 após 3 h de inoculação.

Comparando-se as curvas apresentadas nas Figuras 21 e 22 verifica-se que, apesar de ter-se obtido população de *Salmonella* ligeiramente superior, quando se procedeu à sementeira, se comparado à população determinada por PCR-RT, ambas as curvas apresentam mesma configuração.

Estes resultados obtidos com PCR-RT e o gene *tuf*, assim como já apresentado para *ttr*, diferem do relatado por Wolffs et al. (2005b), que encontraram com a PCR-RT valores superiores à sementeira em ágar.

Tabela 18. Valores médios de UFC eq e respectivos C_t de *S. Typhimurium* determinados por RT-PCR-RT empregando *tuf*-RNA.

Tempo (h) [■]	<i>Salmonella</i> BB441		<i>Salmonella</i> 51K61	
	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL $\pm$ DP [▲])	C_t $\pm$ DP [*]	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL $\pm$ DP)	C_t $\pm$ DP
T ₀ (0)	$1,6 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^5$	$29,8 \pm 0,39$	$2,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$	$31,3 \pm 0,85$
T ₁ (1)	$4,4 \times 10^7 \pm 6,8 \times 10^6$	$24,8 \pm 0,22$	$4,5 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^6$	$23,8 \pm 0,65$
T ₂ (2)	$5,0 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$	$21,2 \pm 0,53$	$1,1 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^7$	$19,2 \pm 0,13$
T ₃ (3)	$4,8 \times 10^9 \pm 3,5 \times 10^8$	$17,8 \pm 0,11$	$4,2 \times 10^9 \pm 2,7 \times 10^7$	$17,2 \pm 0,09$
T ₄ (4)	$8,6 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^9$	$16,9 \pm 0,30$	$3,4 \times 10^8 \pm 1,0 \times 10^7$	$20,8 \pm 0,42$
T ₅ (5)	$9,0 \times 10^9 \pm 4,6 \times 10^9$	$17,0 \pm 0,71$	$1,1 \times 10^8 \pm 3,4 \times 10^6$	$22,5 \pm 0,48$
T ₆ (6)	$1,7 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^8$	$19,3 \pm 0,16$	$3,5 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$	$24,4 \pm 1,17$
T ₇ (27)	$7,8 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$	$24,0 \pm 0,22$	$4,5 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$	$23,7 \pm 0,49$

■ intervalo de tempo entre amostragens

▲ Unidade Formadora de Colônia equivalente (UFC eq) $\pm$ desvio padrão (DP)

* valores C_t médios obtidos por PCR-RT $\pm$ desvio padrão (DP)

A viabilidade de *Salmonella* foi estimada pela divisão do número de UFC eq do *tuf*-RNA obtido por RT-PCR-RT pelo UFC eq obtido para *tuf* por PCR-RT.

Para facilitar a comparação dos dados apresentados (Tabelas 17 e 18) e o cálculo da viabilidade de *Salmonella*, construíram-se as Tabelas 18, 19 e Figura 23 (A e B). Observa-se que, tanto para a cepa BB441 como para 51K61, a maior taxa de viabilidade foi verificada com duas horas de incubação atingindo índices máximos de 746,3 para BB441 (Tabela 19) e de 164,2 para a cepa 51K61 (Tabela 20) (Figura

23 A e B). A viabilidade cai sensivelmente para a cepa BB441 entre 2 e 3 h de incubação.

Figura 21. Populações médias de *S. Typhimurium* (BB441) em caldo Luria-Bertani determinada por semeadura em ágar LB, por RT-PCR-RT e PCR-RT empregando como alvo *tuf*.

Figura 22. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) em caldo Luria-Bertani determinada por semeadura em ágar LB, por RT-PCR-RT e PCR-RT empregando como alvo *tuf*.

Tabela 19. População média de *S. Typhimurium* (BB441) inoculada em caldo Luria-Bertani, incubada a 37 °C e determinada por semeadura em ágar LB (UFC/mL), por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da cultura.

Tempo (h) ■	<i>Salmonella</i> BB441			
	UFC/mL ± DP	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL ± DP) ▲	<i>tuf</i> (UFC eq/mL ± DP)	Viabilidade °
T ₀ (0)	4,2 x 10 ⁶ ± 4,0 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁶ ± 3,8 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵ ± 5,1 x 10 ⁴	7,3
T ₁ (1)	3,9 x 10 ⁶ ± 5,8 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁷ ± 6,8 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁵ ± 4,7 x 10 ⁴	81,5
T ₂ (2)	9,9 x 10 ⁶ ± 1,1 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁸ ± 1,7 x 10 ⁸	6,7 x 10 ⁵ ± 2,1 x 10 ⁵	746,3
T ₃ (3)	5,5 x 10 ⁷ ± 1,7 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁹ ± 3,5 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁷ ± 4,1 x 10 ⁶	240,0
T ₄ (4)	7,1 x 10 ⁸ ± 1,1 x 10 ⁶	8,6 x 10 ⁹ ± 1,8 x 10 ⁹	4,9 x 10 ⁷ ± 2,5 x 10 ⁷	176,0
T ₅ (5)	3,4 x 10 ⁹ ± 7,9 x 10 ⁸	9,0 x 10 ⁹ ± 4,6 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁸ ± 5,0 x 10 ⁷	50,0
T ₆ (6)	8,3 x 10 ⁹ ± 6,1 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁹ ± 1,9 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸ ± 1,5 x 10 ⁸	4,3
T ₇ (27)	6,4 x 10 ⁹ ± 6,0 x 10 ⁸	7,8 x 10 ⁷ ± 1,1 x 10 ⁷	8,7 x 10 ⁸ ± 1,2 x 10 ⁸	0,1

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

▲ Unidade Formadora de Colônia equivalente (UFC eq) ± desvio padrão (DP)

° viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

Tabela 20. População média de *S. Typhimurium* (51K61) inoculada em caldo Luria-Bertani, incubado a 37 °C e determinada por semeadura em ágar LB (UFC/mL), por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da cultura.

Tempo (h) [■]	<i>Salmonella</i> 51K61			
	UFC/mL ± DP	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL ± DP) [▲]	<i>tuf</i> (UFC eq/mL ± DP)	Viabilidade [○]
T ₀ (0)	2,4 x 10 ⁶ ± 1,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵ ± 1,1 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵ ± 1,6 x 10 ⁴	1,3
T ₁ (1)	3,0 x 10 ⁶ ± 5,0 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷ ± 2,2 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁵ ± 5,0 x 10 ⁴	61,6
T ₂ (2)	2,5 x 10 ⁷ ± 5,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁹ ± 1,0 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁶ ± 6,1 x 10 ⁵	164,2
T ₃ (3)	5,9 x 10 ⁸ ± 5,5 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁹ ± 2,7 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁷ ± 6,5 x 10 ⁶	127,3
T ₄ (4)	4,3 x 10 ⁹ ± 1,2 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸ ± 1,0 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁸ ± 5,2 x 10 ⁷	2,1
T ₅ (5)	4,7 x 10 ⁹ ± 6,7 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸ ± 3,4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁸ ± 3,3 x 10 ⁷	0,6
T ₆ (6)	1,1 x 10 ¹⁰ ± 1,2 x 10 ⁹	3,5 x 10 ⁷ ± 3,1 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁸ ± 4,7 x 10 ⁷	0,1
T ₇ (27)	4,4 x 10 ⁹ ± 7,4 x 10 ⁸	4,5 x 10 ⁷ ± 1,6 x 10 ⁶	7,1 x 10 ⁸ ± 1,5 x 10 ⁸	0,1

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

▲ Unidade Formadora de Colônia equivalente (UFC eq) ± desvio padrão (DP)

○ viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

A.

B.

Figura 23. Viabilidade de *S. Typhimurium* BB441 (A) e 51K61 (B) incubadas em caldo Luria-Bertani empregando o gene *tuf*. Define-se viabilidade como sendo a relação entre número de cópias de RNA (UFC eq *tuf*-RNA) e número de cópias de DNA (UFC eq *tuf*).

A definição de viabilidade celular não é simples e nem direta, mas os diversos pesquisadores consideram que células viáveis são aquelas capazes de produzir mRNA para alguma síntese protéica (Rijpens et al., 2002; Sheridan et al., 1998; Vaitilingom et al., 1998). Isto porque a produção de mRNA por células bacterianas viáveis é rápida, e a maioria dos mRNA tem meia-vida de apenas alguns minutos (Carpousis et al., 1999). Apesar de seu emprego como indicador de viabilidade

celular vir ganhando aceitação, há ainda questionamentos sobre sua validade, pois sua meia-vida poder ser influenciada pela forma de inativação da bactéria (Sheridan et al, 1998) e pela temperatura de armazenamento da cultura inativada (Sheridan et al., 1999), dentre outros fatores.

A escolha do gene a ser empregado também pode influenciar na correlação mRNA-viabilidade (Rijpens et al., 2002).

Cools et al. (2006) desenvolveram um NASBA-tempo real para detectar e avaliar a viabilidade de *Campylobacter jejuni*. Primers e sondas específicos foram desenhados para amplificar um fragmento de 203 pb do gene *tuf* e 173 pb para o gene *GTPase*. A detecção foi através do sistema molecular beacon adicionada na mistura de reação. Os pesquisadores extraíram o RNA de células viáveis e de células submetidas a três tipos de estresse. Eles concluíram que o *tuf*-RNA é uma molécula altamente estável, podendo persistir por mais de 48 h após a exposição aos tratamentos de inativação da célula bacteriana, não sendo, assim, um bom indicador de viabilidade para *C. jejuni*. Além disso, destacam que estudos com outros genes *housekeeping* menos estáveis e expressos em todos os estados fisiológicos da célula precisam ser testados.

Os resultados encontrados neste estudo para viabilidade não puderam ser comparados aos de outros pesquisadores por não terem sido encontrados na literatura trabalhos que empregassem este tipo de avaliação.

Para poder avaliar se o *tuf* é realmente um gene adequado para quantificação de *Salmonella* empregando RT-PCR-RT, há necessidade de se realizar novos estudos para avaliar a estabilidade do seu transcrito.

4.5.2. Avaliação em alimentos-modelo

Nenhum dos alimentos-modelo usados neste estudo apresentou *Salmonella* endógena.

A. Avaliação empregando população elevada de *Salmonella*

Experimentos realizados em paralelo a este estudo, mas não apresentados aqui, indicaram a superexpressão do gene *tuf* pela cepa BB441. Deste modo, esta

cepa deixou de ser utilizada nos experimentos com alimentos-modelo, pois poderia originar resultados falsos nos diferentes tratamentos.

As amostras de alimentos-modelo foram inoculadas com a cepa 51K61, de forma a conter aproximadamente 10^6 UFC/mL, e divididas em duas porções, sendo uma incubada à temperatura ambiente (20 °C) e a outra a 8 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas foram submetidas à enumeração de células viáveis por semeadura, ao PCR-RT e ao RT-PCR-RT.

A população de microrganismos mesófilos encontrada nos alimentos-modelo no T_0 foi de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para ambos os modelos (Tabela 21), sendo que no modelo ave atingiu $9,9 \times 10^9$ UFC/mL após 333 h de manutenção a 20 °C e $6,0 \times 10^8$ UFC/mL para o modelo suíno. A população máxima de microrganismos mesófilos da porção mantida a 8 °C no T_5 foi de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL, para o modelo ave, e de $1,7 \times 10^8$ UFC/mL, para o modelo suíno.

A população de *Salmonella* inoculada foi de $1,3 \times 10^6$ UFC/mL no modelo ave e $1,0 \times 10^6$ UFC/mL no suíno (Tabela 21). Estas populações atingiram valores ao redor de 10^9 UFC/mL, em ambos, após 333 h de manutenção à temperatura ambiente, de $6,3 \times 10^7$ UFC/mL a 8 °C, em modelo ave, e de $1,6 \times 10^8$ UFC/mL em suíno.

Comparando-se as curvas apresentadas nas Figuras 24 e 25, observa-se que quando o alimento-modelo ave foi mantido à temperatura de refrigeração (Figura 25), a população estimada, empregando-se a RT-PCR-RT, apresentou em até 45 h, comportamento semelhante àquela observada pela semeadura, apenas ligeiramente inferior ($p > 0,05$).

Já para aquelas amostras mantidas à temperatura ambiente esta correlação parece existir apenas até 21 h de incubação, inclusive para os valores obtidos pelo emprego da PCR-RT. Estatisticamente, entretanto, as diferenças observadas, entre os resultados obtidos com o método convencional e os moleculares não são significativas ($p > 0,05$). Por outro lado, os métodos moleculares apresentaram desempenho distinto ($p < 0,05$) entre si.

Para o modelo suíno (Figuras 26 e 27) observa-se comportamento semelhante entre as curvas obtidas pelos métodos moleculares quando comparados ao convencional, em até 45 h de incubação para as amostras mantidas à temperatura ambiente (Figura 26) ($p > 0,05$). Entretanto, os métodos moleculares tiveram desempenho diferente entre si ($p < 0,05$).

Já para as amostras mantidas a 8 °C, apesar da aparente correlação entre RT-PCR-RT e o método convencional (Figura 27), os resultados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Também para esta temperatura, os resultados obtidos com os métodos moleculares não são equivalentes ($p < 0,05$).

A viabilidade de populações elevadas de *Salmonella* em ambos os alimentos-modelo mantidos a 20 °C foi maior após três horas de inoculação (Figuras 28 e 29; Tabelas 22 e 23), sendo este índice de 17,3 para modelo ave e de 85,4 para o modelo suíno. Nesta temperatura, observou-se também uma maior queda (após 3 h) na expressão de *tuf* em ambos os alimentos-modelo. Quando as amostras foram armazenadas a 8 °C o índice máximo foi observado em 21 h de incubação para modelo ave (12,1) e em 45 h para modelo suíno (46,4). Percebe-se um retardamento quanto à queda na expressão do *tuf* quando ambos os alimentos-modelo foram mantidos refrigerados.

Observou-se que independente do alimento ou do método empregado (RT-PCR-RT ou PCR-RT) a relação entre os resultados foi linear (Anexo VII, A a D; Anexo VIII, A a D).

Tabela 21. População média de *S. Typhimurium* (51K61) artificialmente inoculada em alimentos-modelo ave e suíno e incubada em diferentes temperaturas por diferentes intervalos de tempo.

Tempo (h [■])	Modelo ave (UFC/mL)				Modelo suíno (UFC/mL)			
	20 °C		8 °C		20 °C		8 °C	
	Mesófilos [♦]	<i>Salmonella</i> [▲]	Mesófilos	<i>Salmonella</i>	Mesófilos	<i>Salmonella</i>	Mesófilos	<i>Salmonella</i>
T ₀ (0)	1,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	-	-	1,5 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	-	-
T ₁ (3)	1,0 x 10 ⁷	4,9 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶
T ₂ (21)	1,9 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁷
T ₃ (45)	3,6 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁷
T ₄ (165)	4,7 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	4,9 x 10 ⁷	4,9 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁷
T ₅ (333)	9,9 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	6,3 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹	1,7 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ semeadura em ágar padrão para contagem e incubação a 37 °C

▲ semeadura em ágar XLD

Figura 24. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 25. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 26. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 27. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 28. Viabilidade obtida para *S. Typhimurium* (51K61) no modelo ave durante o período de 165 horas após a inoculação. Para definição de viabilidade consultar a Figura 23.

Figura 29. Viabilidade obtida para *S. Typhimurium* (51K61) no modelo suíno durante o período de 165 horas após a inoculação. Para definição de viabilidade consultar a Figura 23.

Tabela 22. Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da população de *S. Typhimurium* (51K61) em alimento-modelo ave armazenado a diferentes temperaturas.

Tempo (h) ■	20°C					8°C				
	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t ♦	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade ▶	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade
T ₀ (0)	9,1 x 10 ⁵	29,2	4,5 x 10 ⁵	22,6	2,0	9,1 x 10 ⁵	29,2	4,5 x 10 ⁵	22,6	2,0
T ₁ (3)	1,9 x 10 ⁷	24,4	1,1 x 10 ⁶	21,2	17,3	7,5 x 10 ⁵	29,4	5,4 x 10 ⁵	22,3	1,4
T ₂ (21)	9,9 x 10 ⁶	25,4	1,1 x 10 ⁷	17,9	1,0	3,5 x 10 ⁶	27,0	2,9 x 10 ⁵	23,2	12,1
T ₃ (45)	3,2 x 10 ⁶	27,2	1,7 x 10 ⁷	17,1	0,2	4,1 x 10 ⁶	26,8	4,5 x 10 ⁵	22,6	9,1
T ₄ (165)	1,2 x 10 ⁴	35,8	1,4 x 10 ⁷	17,3	0	1,7 x 10 ⁴	35,2	7,8 x 10 ⁵	21,8	0

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ valor original do C_t medido (etapas de diluições não incluídas)

▶ viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

Tabela 23. Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da população de *S. Typhimurium* (51K61) em alimento-modelo suíno armazenado a diferentes temperaturas.

Tempo (h) ■	20 °C					8 °C				
	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t ♦	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade ▶	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade
T ₀ (0)	9,2 x 10 ⁵	29,2	5,2 x 10 ⁵	22,4	2,0	9,2 x 10 ⁵	29,2	5,2 x 10 ⁵	22,4	2,0
T ₁ (3)	8,2 x 10 ⁷	22,2	9,6 x 10 ⁵	21,5	85,4	1,4 x 10 ⁶	28,5	4,7 x 10 ⁵	22,5	3,0
T ₂ (21)	3,1 x 10 ⁸	20,1	1,7 x 10 ⁷	17,2	18,2	9,7 x 10 ⁶	25,5	4,9 x 10 ⁵	22,5	20,0
T ₃ (45)	4,2 x 10 ⁸	19,6	1,4 x 10 ⁷	17,5	30,0	3,9 x 10 ⁷	23,3	8,4 x 10 ⁵	21,6	46,4
T ₄ (165)	7,0 x 10 ⁵	29,5	4,3 x 10 ⁷	15,8	0	6,5 x 10 ⁶	26,1	1,2 x 10 ⁶	21,2	5,4

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ valor original do C_t medido (etapas de diluições não incluídas)

▶ viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

B. Avaliação empregando população baixa de *Salmonella*

As amostras de alimentos-modelo foram inoculadas com a cepa 51K61, de modo a conter aproximadamente 10^2 UFC/mL, e divididas em três porções que foram mantidas uma à temperatura ambiente (20 °C), outra a 8 °C e a terceira mantida a 4 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas foram retiradas e submetidas à enumeração de células viáveis por semeadura, ao PCR-RT e ao RT-PCR-RT. A porção mantida a 4 °C somente foi usada para a enumeração da população viável de *Salmonella* e da população de microrganismos mesófilos por métodos convencionais e serviu como controle.

A população de microrganismos mesófilos encontrada nos alimentos-modelo no T_0 foi de $7,0 \times 10^4$ UFC/mL, para o modelo ave, e de $2,1 \times 10^3$ UFC/mL (Tabela 23) para o modelo suíno, sendo que, no modelo ave, atingiu $2,2 \times 10^9$ UFC/mL, após 358 h de manutenção a 20 °C, e o modelo suíno de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL. A população de mesófilos para ambas as porções de alimentos-modelo mantidas a 8 °C foi igual, $2,1 \times 10^9$ UFC/mL no T_6 (Tabela 23). Para as porções incubadas a 4 °C, a população no T_6 foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, para o modelo ave, e de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL, para o suíno (Tabela 23).

A população de *Salmonella* inoculada foi de $7,0 \times 10^2$ no modelo ave e $3,0 \times 10^2$ UFC/mL no suíno (Tabela 24). Em ambos os alimentos-modelo, as populações foram menores que 10^4 após 358 h de manutenção à temperatura ambiente e <10 quando incubados a 8 °C e a 4 °C, respectivamente.

Como estes experimentos só foram realizados uma única vez, não há como afirmar se este comportamento é decorrente da própria cepa empregada ou de falhas experimentais. Este estudo deverá ser repetido para que os resultados possam ser confirmados.

Comparando-se as curvas apresentadas na figura 30, observa-se que, quando o alimento-modelo ave foi mantido à temperatura ambiente, parece haver correlação entre a população estimada, empregando-se os três métodos, apenas até 24 h de incubação. Entretanto, os valores obtidos com o método convencional e os moleculares não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). Já a comparação entre os métodos moleculares indicou diferença estatisticamente significativa entre seu desempenho ($p < 0,05$).

Já para as amostras mantidas a 8 °C (Figura 31), verifica-se comportamento semelhante entre os três métodos por até 72 h ($p \geq 0,05$); mas os métodos moleculares, quando comparados entre si, não apresentaram desempenho equivalente ($p < 0,05$).

Para o modelo suíno (Figuras 33 e 34), observa-se comportamento semelhante entre as curvas obtidas pelos três métodos, em até 24 h de incubação, tanto para as amostras mantidas a 20 °C como para aquelas mantidas a 8 °C ($p \geq 0,05$). Diferentemente do observado para o modelo ave, os métodos moleculares apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ($p = 0,05$).

A viabilidade de *Salmonella* inoculada em populações baixas em alimentos-modelo mantidos a 20 °C foi maior em 6 h e 24 h de inoculação (Figuras 34 e 35; Tabelas 25 e 26), sendo este índice de 65,3 para modelo ave e de 600 para o modelo suíno, respectivamente. Quando armazenadas a 8 °C o índice máximo foi observado em 72 h de incubação para modelo ave (27) e para modelo suíno (58). O mesmo comportamento de queda na expressão do gene *tuf* observada na população alta de *Salmonella* persistiu na população baixa, ou seja, alimentos-modelo mantidos a 20 °C apresentaram uma queda mais rápida do que aqueles mantidos a 8 °C.

Verificou-se que em todas as condições de armazenamento para ambos os modelos, independente do método, houve elevada relação de linearidade entre os resultados obtidos (Anexo IX, A a D; Anexo X, A a D).

Tabela 24. Enumeração de população viável em alimentos-modelo (ave e suíno) coletados em diferentes intervalos de tempo empregando-se ágar PCA e XLD (UFC/mL).

Tempo (h)▪	Modelo ave (UFC/mL)						Modelo suíno (UFC/mL)					
	20 °C		8 °C		4 °C		20 °C		8 °C		4 °C	
	Mesófilos♦	Salmonella▲	Mesófilos°	Salmonella	Mesófilos	Salmonella	Mesófilos	Salmonella	Mesófilos	Salmonella	Mesófilos	Salmonella
T ₀ (0)	7,0 x 10 ⁴	7,0 x 10 ²	-	-	-	-	2,1 x 10 ³	3,0 x 10 ²	-	-	-	-
T ₁ (3)	8,5 x 10 ⁵	1,0 x 10 ³	3,9 x 10 ⁵	1,0 x 10 ³	7,1 x 10 ⁴	<10 ²	8,5 x 10 ³	4,0 x 10 ³	3,0 x 10 ³	<10 ²	1,5 x 10 ³	1,0 x 10 ³
T ₂ (6)	9,9 x 10 ⁶	<10 ³	5,5 x 10 ⁴	<10 ³	7,3 x 10 ⁴	<10 ²	8,5 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	<10 ³	2,5 x 10 ³	1,0 x 10 ³
T ₃ (24)	5,6 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁷	1,0 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴	3,9 x 10 ²	8,9 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³	2,1 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²
T ₄ (72)	5,7 x 10 ⁸	7,7 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁸	5,0 x 10 ³	5,6 x 10 ⁴	3,4 x 10 ²	7,8 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ³	3,3 x 10 ⁴	4,6 x 10 ²
T ₅ (215)	9,6 x 10 ⁹	9,0 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁹	4,5 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁷	1,9 x 10 ²	1,6 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁹	1,1 x 10 ⁹	<10 ³	3,3 x 10 ⁶	3,8 x 10 ³
T ₆ (358)	2,2 x 10 ⁹	<10 ⁴	2,1 x 10 ⁹	<10	1,5 x 10 ⁸	<10	1,5 x 10 ⁹	<10 ⁴	2,1 x 10 ⁹	<10	2,2 x 10 ⁷	<10

▪ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ semeadura em ágar padrão para contagem e incubação a 37 °C

▲ semeadura em ágar XLD

° semeadura em ágar padrão para contagem e incubação a 37 °C

Figura 30. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 31. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (ave) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 32. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 20 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 33. Populações médias de *S. Typhimurium* (51K61) obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 8 °C e determinadas por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), PCR-RT (*tuf*) e semeadura em ágar XLD (UFC/mL).

Figura 34. Viabilidade obtida para *S. Typhimurium* (51K61) no modelo ave durante o período de 358 horas após a inoculação. Define-se viabilidade como sendo a relação entre número de cópias de RNA (UFC eq *tuf*-RNA) e número de cópias de DNA (UFC eq *tuf*).

Figura 35. Viabilidade obtida para *S. Typhimurium* (51K61) no modelo suíno durante o período de 358 horas após a inoculação. Para definição de viabilidade consultar a Figura 34.

Tabela 25. Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da população de *S. Typhimurium* (51K61) em alimento-modelo ave armazenado a diferentes temperaturas.

Tempo (h) ■	20 °C					8 °C				
	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t ♦	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade ►	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade
T ₀ (0)	9,4 x 10 ²	38,7	8,0 x 10 ²	32,5	1,2	9,4 x 10 ²	38,7	8,0 x 10 ²	32,5	1,2
T ₁ (3)	4,2 x 10 ⁴	33,2	9,3 x 10 ²	32,1	45,2	5,8 x 10 ³	36,1	3,7 x 10 ²	33,5	16,0
T ₂ (6)	3,2 x 10 ⁵	30,3	4,9 x 10 ³	29,4	65,3	5,1 x 10 ³	36,3	3,3 x 10 ²	33,7	15,5
T ₃ (24)	2,8 x 10 ⁶	27,2	1,6 x 10 ⁵	23,9	17,5	6,5 x 10 ³	35,9	2,5 x 10 ³	30,8	3,0
T ₄ (72)	7,3 x 10 ⁵	29,1	4,3 x 10 ⁵	22,3	2,0	1,3 x 10 ⁴	34,9	4,9 x 10 ²	33,2	27,0
T ₅ (215)	5,3 x 10 ⁴	32,9	2,5 x 10 ⁵	23,1	0,2	2,0 x 10 ²	41,5	8,9 x 10 ²	32,2	0,2
T ₆ (358)	6,8 x 10 ⁴	31,5	2,7 x 10 ⁴	26,7	2,5	5,2 x 10 ²	39,6	3,6 x 10 ²	33,6	1,4

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ valor original do C_t medido (etapas de diluições não incluídas)

► viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

Tabela 26. Valores médios de UFC eq determinados por RT-PCR-RT (*tuf*-RNA), por PCR-RT (*tuf*) e viabilidade da população de *S. Typhimurium* (51K61) em alimento-modelo suíno armazenado a diferentes temperaturas.

Tempo (h) ■	20 °C					8 °C				
	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t ♦	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade ▶	<i>tuf</i> -RNA (UFC eq/mL)	C _t	<i>tuf</i> (UFC eq/mL)	C _t	Viabilidade
T ₀ (0)	-	-	2,7 x 10 ²	34,0	-	-	-	2,7 x 10 ²	34,0	-
T ₁ (3)	2,2 x 10 ⁴	34,2	1,4 x 10 ³	31,4	39,3	2,9 x 10 ³	37,8	5,9 x 10 ²	33,0	5,0
T ₂ (6)	1,6 x 10 ⁵	31,3	6,6 x 10 ³	28,9	61,5	2,2 x 10 ³	37,6	2,6 x 10 ²	34,1	8,5
T ₃ (24)	5,1 x 10 ⁸	19,6	2,1 x 10 ⁶	19,8	600,0	6,1 x 10 ³	36,1	1,8 x 10 ³	31,3	3,4
T ₄ (72)	1,0 x 10 ⁸	21,9	8,8 x 10 ⁶	17,4	30,0	3,3 x 10 ⁴	33,6	5,6 x 10 ²	32,9	58,0
T ₅ (215)	1,1 x 10 ⁷	25,1	5,3 x 10 ⁶	18,3	5,2	-	-	1,5 x 10 ³	31,3	-
T ₆ (358)	6,4 x 10 ⁵	29,3	6,2 x 10 ⁵	21,7	3	-	-	2,3 x 10 ²	34,3	-

■ tempo em horas após inoculação da amostra (T₀)

♦ valor original do C_t medido (etapas de diluições não incluídas)

▶ viabilidade = relação entre UFC eq *tuf*-RNA / UFC eq *tuf*

- não quantificado pelo RT-PCR-RT

O uso de métodos empregando transcriptase reversa (RT-PCR) iniciou-se no princípio da década passada (Weiss et al., 1992), porém havia necessidade de emprego de eletroforese em gel. A evolução tecnológica levou ao desenvolvimento de equipamentos de PCR de segunda geração que permitiram a detecção em tempo real do produto amplificado, sem necessidade de utilização de eletroforese. Assim, a RT-PCR pode ser realizada também em tempo real recebendo neste trabalho o nome de RT-PCR-RT. Revisões completas sobre RT-PCR e RT-PCR-RT foram publicadas por Bustin (2000, 2002); Bustin et al. (2005) e por Freeman et al. (1999).

Dentre as vantagens da RT-PCR-RT destacam-se a sua elevada sensibilidade, a possibilidade de se trabalhar com volumes pequenos de amostra, a não necessidade de processamento da amostra após a PCR e a possibilidade de uso como ferramenta para quantificação da população bacteriana (Bustin et al., 2005).

Um dos trabalhos pioneiros de detecção em alimentos de bactérias viáveis, bolores e leveduras por RT-PCR foi conduzido por Vaitilingom et al. (1998). Empregando amostras de leite pasteurizado artificialmente contaminadas estes pesquisadores desenvolveram um RT-PCR multiplex para detectar o produto de transcrição do gene EF-Tu de *Escherichia coli* e do gene EF-1 α de *Saccharomyces cerevisiae* e *Mucor racemosus* em uma única reação. Os autores verificaram que o gene EF-Tu pode ser considerado um bom indicador de viabilidade tanto para organismos procariotos como para eucariotos.

Szabo e Mackey (1999) propuseram um método para detectar *Salmonella* Enteritidis PT-4 em carne moída e ovos empregando RT-PCR; o gene alvo foi *sefA*. Quando comparado à PCR convencional, o novo método mostrou-se útil, uma vez que não detectava células bacterianas inativadas termicamente. Outros trabalhos, porém não relacionados a alimentos, também foram encontrados (Rijpens et al., 2002; Sails et al., 1998; Shiao, 2003).

Um método de RT-PCR-RT para detecção de norovírus em amostras de marisco naturalmente contaminadas foi descrito por Jathikumar et al. (2005). Comparando os resultados obtidos com este novo método a outro método molecular (*nested* PCR) eles verificaram que RT-PCR-RT mostrou maior

sensibilidade, permitindo a detecção de <10 cópias do genoma viral em menos de 90 min.

O único trabalho encontrado na literatura, até o momento, empregando RT-PCR-RT para detecção de patógenos em alimentos, foi publicado por Sharma (2006). O pesquisador descreveu um RT-PCR-RT multiplex para detecção específica e simultânea dos genes *rfbE* e *eae* de *Escherichia coli* O157:H7. A detecção baseou-se na sonda TaqMan. Empregando este método, o pesquisador conseguiu detectar níveis de RNA equivalentes a 1 UFC/g de fezes bovinas artificialmente contaminadas. Ele conclui que o método proposto é aplicável para detecção rápida de baixas populações do patógeno.

Para avaliar e quantificar a expressão do gene *mntH* de cepas de *Salmonella* entérica submetidas a condições simulando o interior de fagossomos, Botteldoorn et al. (2006) desenvolveram uma RT-PCR-RT. Eles verificaram que o método foi eficiente, permitindo verificar a maior expressão de *mntH* no início da fase exponencial de multiplicação, seguido de queda desta expressão ao final da fase exponencial.

González-Escalona et al. (2006) quantificaram células de *Vibrio cholerae* por RT-PCR-RT nos estágios fisiológicos viável não-cultivável e *starvation*. Analisando os resultados, eles confirmaram que o produto da transcrição dos genes *tuf*, *relA* ou *rpoS*, envolvidos no metabolismo celular, foram detectados mesmo quando as células foram expostas a fatores de estresse. Eles destacam que a eficiência de amplificação variou de 79 a 94%.

Coutard et al. (2007) desenvolveram RT-PCR-RT para determinar a indução da expressão de genes de virulência e *housekeeping* de *Vibrio parahaemolyticus* que passaram de estado viável não-cultivável para cultivável. Eles verificaram que nas condições empregadas não houve indução dos genes de virulência selecionados, sendo que a doença é causada principalmente pela interação patógeno-hospedeiro.

Jacobsen e Holben (2007) apresentam um método para quantificação de mRNA de *Salmonella*, artificialmente inoculada em solo e em fezes de aves, empregando hibridização por captura magnética seguida de RT-PCR-RT. Ao comparar os resultados obtidos com o novo método com aquele da quantificação por PCR tradicional, verificou-se que o novo método tem a vantagem de não

permitir a quantificação de células inativadas por tratamento térmico, conforme já havia sido verificado por outros pesquisadores.

Uma das críticas aos métodos moleculares é que existe a possibilidade de detecção e quantificação de DNA proveniente de células bacterianas mortas. Para evitar este tipo de erro, técnicas diferentes têm sido sugeridas, como o emprego de *flotation* – uma variante da centrifugação por gradiente de densidade (Wolffs et al., 2004, 2005a, b), ou o emprego de corante etídeo-monoazida (EMA). EMA pode entrar seletivamente nas células cuja membrana esteja danificada e ligar-se covalentemente ao DNA, inibindo a PCR (Nocker et al., 2006; Nogva et al., 2003). Outra forma de superar este problema é o emprego da RT-PCR-RT.

Neste estudo também constatou-se que com o emprego da RT-PCR-RT não se quantificou o RNA de células mortas, conforme pode ser verificado nas figuras 24 a 27 e 30 a 33. O uso de *tuf* como indicador de viabilidade celular mostrou-se bastante eficiente.

A conversão de RNA para cDNA é uma etapa importante e crítica, que contribui para as variações e a falta de reprodutibilidade freqüentemente observadas nos experimentos RT-PCR. Para Bustin et al. (2005) existem três razões para isto acontecer. Primeiramente, o estado dinâmico das células promove variação inerente no RNA; segundo, o RNA purificado pode apresentar qualidade variável e, uma vez extraído, apresenta-se instável. Por último, a eficiência da conversão de RNA para cDNA é dependente da disponibilidade do molde.

Além disso, a técnica empregada para a produção e quantificação do cDNA também pode influenciar na sua qualidade. Neste estudo, empregou-se a reação em uma única etapa, na qual todos os processos (transcrição e amplificação) são realizados em um único tubo.

Apesar de alguns autores considerarem este processo menos sensível que o protocolo em duas etapas (Battaglia et al., 1998), neste estudo isso não foi constatado, sendo a sensibilidade de 2 log UFC eq.

Um fator limitante quando se prepara as curvas padrão para um método baseado em transcriptase reversa é a presença de DNA após a etapa de transcriptase (Matthews et al., 2002). Sua eliminação deve ser eficiente para evitar interferência quando da quantificação do cDNA.

Neste estudo, o produto da transcrição foi tratado com solução DNase I por duas vezes e por 20 min, o que garantiu a eliminação de DNA residual. Este mesmo protocolo, empregando dois tratamentos consecutivos com DNase I, foi aplicado às amostras.

Em geral é enfatizada, para os ensaios baseados em PCR-RT ou RT-PCR-RT, a rapidez para a realização dos mesmos, com poucos pesquisadores se preocupando com o custo dos reagentes, de equipamentos ou a necessidade de haver pessoal técnico especializado para a realização do trabalho. Por outro lado, estes métodos têm a possibilidade de virem a ser automatizados, o que reduziria em muito seu custo e necessidade de especialização de técnicos.

Entretanto, o emprego destes métodos na rotina laboratorial da indústria de alimentos, ou mesmo dos laboratórios de saúde pública, de nosso país, ainda está longe de se tornar realidade.

O desenvolvimento de um teste rápido que apresente o resultado em curto período de tempo, que seja simples, sensível para detectar baixos níveis de microrganismos, preciso e que não seja caro seria o mais adequado. No entanto, até o presente momento, não se tem um teste que apresente todos esses atributos concomitantemente.

Trabalhos futuros envolvendo desenvolvimento de métodos baseados em PCR-RT e a RT-PCR-RT deveriam buscar a melhoria no limite de detecção, a fim de se obter maior sensibilidade do método.

Também é importante que seja avaliada a meia-vida do *tuf*-RNA, para que se possa, com maior precisão, quantificar somente RNA de células viáveis e verificar as formas de inativação do microrganismo, conforme apresentado por outros pesquisadores (Jacobsen e Holben, 2007; Rijpens et al., 2002; Sheridan et al., 1998).

Além disso, é importante também que métodos baseados na PCR-RT e na RT-PCR-RT sejam validados frente a matrizes alimentares naturalmente contaminadas. Sabe-se que os microrganismos presentes nos alimentos não estão nas mesmas condições fisiológicas que células recém-cultivadas em laboratório, o que pode influenciar nos resultados.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e na discussão apresentada pode-se concluir que:

- O QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit é um método eficiente na recuperação do DNA de *Salmonella* em material fecal, propiciando isolamento de DNA de boa qualidade.
- O ensaio para quantificação de *Salmonella* por PCR-tempo real, empregando como alvo *ttr*, foi eficiente quando se empregou meio de cultura e fezes.
- O método validado pela PCR-RT, empregando como alvo *ttr*, apresentou menor concordância para a quantificação direta de *Salmonella* em fezes do que o método convencional.
- Os métodos PCR-RT e RT-PCR-RT, empregando como alvo *tuf*, mostraram-se potencialmente eficientes, mas ainda precisam ser submetidos a novas avaliações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKARIM, F.; HUGHES, D. Homologous recombination between the *tuf* genes of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Molecular Biology**, v.260, p.506-522, 1996.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Real-time PCR and high performance SNP detection and allelic discrimination**. Atualizado em 2008. Disponível em: http://www.apczech.cz/pdf/DF_SNP_and_allelic.pdf. Acesso em: 08 jul. 2008.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Real-time PCR and gene expression analysis**. Disponível em: www.apczech.cz/pdf/DF_gene_expression.pdf. Acesso em: 06 jul. 2006.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S.; *Salmonella*. In: Downes, F.P.; Ito, K., eds. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: APHA, 2001. p.357-380.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR versus traditional PCR**. Disponível em: http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf. Acesso em: 18 jan. 2008.

BATTAGLIA, M.; PEDRAZOLLI, P.; PALERMO, B.; LANZA, A.; BERTOLINI, F.; GIBELLI, N.; Da PRADA, G.A.; ZAMBELLI, A. Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested without false positive results. **Bone Marrow Transplantation**. v.22, p.693-698, 1998.

BERNARD, P.S.; WITTEWER, C.T. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. **Clinical Chemistry**, v.46, n.2, p.147-148, 2000.

BOTTELDOORN, N.; COILLIE, E. V.; GRIJSPEERDT, K.; WERBROUCK, H.; HAESEBROUCK, F.; DONNÉ, E.; D'HAESE, E.; HEYNDRICKX, M.; PASMANS, F.; HERMAN, L. Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p.125-135, 2006.

BRENNER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: Krieg, N.R.; Holt, J. G. Ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Ed. Williams and Wilkins; 1984, 1v, p.427-58.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p.169-193, 2000.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, p.23-39, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p.597-601, 2005.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.15, n.3, p.155-166, 2004.

CARPOUSIS, A.J.; VANZO, N.F.; RAYNAL, L.C. mRNA degradation: a tale of a poly(A) and multiprotein machines. **Trends in Genetics**, v.15, n.1, p.24-28, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. A-Z Index. *Salmonella* Infection [**Salmonellosis**]. General Information: *Salmonella*. October 13, 2005. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm#What%20is%20salmonellosis. Acesso em: 17 jan. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. **Salmonellosis – outbreak investigation, october 2006**. Disponível online: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/outbreak_notice.htm. Acesso em: 27 fev. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases. **Salmonella – Questions and answers related to the outbreak of Salmonella Saintpaul infections associated with tomatoes**. Information updates June, 18, 2008. Disponível online: <http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/faq.html>. Acesso em: 27 fev. 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. SÃO PAULO (Estado). Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. Dados Estatísticos. **Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo**. Atualizado em 2008. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso em: 13 abr. 2008.

CLARK, D.P. **Molecular biology: understanding the genetic revolution**. Boston: Elsevier, 2005. 783p.

COOLS, I.; UYTENDAELE, M.; D'HAESE, E.; NELIS, H.J.; DEBEVERE, J. Development of a real-time NASBA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.2, p.313-320, 2006.

COUTARD, F.; LOZACH, S.; POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.16, p.5183-5189, 2007.

DAUM, L. T.; BARNES, W.J.; McAVIN, J.C.; NEIDERT, M.S.; COOPER, L.A.; HUFF, W.B.; GAUL, L.; RIGGINS, W.S.; MORRIS, S.; SALMEN, A.; LOHMAN, K. L. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspected foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.3050-3052, 2002.

ELLINGSON, J.L.E.; ANDERSON, J.L.; CARLSON, S.A.; SHARMA, V.K. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.51- 57, 2004.

EUROGENTEC. **Your one-stop-step:** real-time suppliers. Disponível em: <http://www.eurogentec.com/uploads/GRT-QQPCR-BOOKLET-0604-V2.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2008.

EYIGOR, A.; CARLI, K.T.; UNAL, C.B. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.37-41, 2002.

EYIGOR, A.; GONCAGUL, G.; GUNAYDIN, E.; CARLI, K. T. *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey. **Avian Pathology**, v.34, n.2, p.102-105, 2005.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.

FEY, A.; EICHLER, S.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M.G.; GUZMÁN, C.A. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p. 3618-3623, 2004.

FLEKNA, G.; SCHNEEWEISS, W.; SMULDERS, F.J.M.; WAGNER, M.; HEIN, I. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.21, n.4, p. 282-287, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. UNITED STATES. Centers for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook “Bad Bug Book”**. December 2, 2005. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>. Acesso em: 17 jan. 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; GELLI, D.S. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. eds. **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcell Decker, 2003. cap.45, p.733-743. (Food Science and Technology, 125).

FREEMAN, W. M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. **BioTechniques**, v.26, n.1, p.112-125, 1999.

FU, C.J.; CARTER, J.N.; LI, Y.; PORTER, J.H.; KERLEY, M. S. Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.5, p.490-494, 2006.

GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; FEY, A.; HÖFLE, M. G.; ESPEJO, R. T.; GUZMÁN, C. A. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. **Environmental Microbiology**, v.8, n.4, p.658-666, 2006.

GUY, R. A.; KAPOOR, A.; HOLICKA, J.; SHEPHERD, D.; HORGAN, P. A. A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1265-1272, 2006.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p.986-994, 1996.

HENSEL, M.; NIKOLAUS, T.; EGELSEER, C. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, v.31, n.2, p.489-498, 1999.

HOFFMANN, B.; DEPNER, K.; SHIRMEIER, H.; BEER, M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.136, n.1/2, p.200-209, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002. 362p. (Microorganisms in foods 7).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579**: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, 2002. 27p.

JACOBSEN, C.S.; HOLBEN, W.E. Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.315-321, 2007.

JATHIKUMAR, N.; LOWTHER, J.A.; HENSILWOOD, K.; LEES, D.N.; HILL, V.R.; VINJÉ, J. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.4, p.1870-1875, 2005.

JOHNSON, D.J.; MARTIN, L.R.; ROBERTS, K.A. STR-typing of human DNA from human fecal matter using the Qiagen QIAamp[®] stool mini kit. **Journal of Forensic Sciences**, v.50, p.802-808, 2005.

JONES, T.F.; IMHOFF, B.; SAMUEL, M.; MSHAR, P.; McCOMBS, K.G.; HAWKINS, M.; DENEEN, V.; CAMBRIDGE, M.; OLSEN, S.J. Limitations to successful investigation and reporting of foodborne outbreaks: an analysis of

foodborne disease outbreaks in FoodNet catchment areas, 1998-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, suppl.3, p.297-302, 2004.

JOSEFSEN, M.H.; JACOBSEN, N.R.; HOORFAR, J. Enrichment followed by quantitative PCR rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p.3588-3592, 2004.

JOSEFSEN, M.H.; KRAUSE, M.; HANSEN, F.; HOORFAR, J. Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.9, p.3040-3048, 2007.

JUNG, S. J.; HYUN-JOONG, K; HAE-YEING, K. Quantitative detection of *Salmonella* Typhimurium contamination in milk, using real-time PCR. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, n.6, p.1353-1358, 2005.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F. P.; Ito, K., eds. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: APHA, 2001. p. 69-82.

LEVIN, R.E. The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. **Food Biotechnology**, v.18, n.1, p.97-133, 2004.

Le MINOR, L. Genus III. *Salmonella lignieris*. In: KRIEG, K.R. and Holt, J.G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v.1, p.427-458.

LI, M.; GONG, J.; COTTRILL, M.; YU, H.; de LANGE, C.; BURTON, J.; TOPP, E. Evaluation of QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, n.1, p.13-20, 2003.

LIE, Y.S.; PETROPOULOS, C.J. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, n. 43, p. 43-48, 1998.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LUDWIG, W.; WEIZENEGGER, M.; BETZL, D.; LEIDEL, E.; LENZ, T.; LUDVIGSEN, A.; MÖLLENHOFF, D.; WENZIG, P.; SCHLEIFER, K.H. Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: functional, structural and phylogenetic. **Archives of Microbiology**, v.153, n.3, p.241-247, 1990.

LUND, M.; NORDENTOFT, S.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 11, p. 5125-5132, 2004.

LUND, M.; NORDENTOPF, S.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p. 5125-5132, 2006.

MALORNY, B.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, p.245-251, 2007.

MALORNY, B.; HOORFAR, J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.7, p.3033-3037, 2005.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.290-296, 2003a.

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, 2003b.

MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time-PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.5, p.1299-1304, 2008.

MALORNY, B.; PACCASSONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH, R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.12, p.7046-7052, 2004.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTRÖM, 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, 2003c.

MATTHEWS, J.L.; CHUNG, M.; MATYAS, R.J. Persistent DNA contamination in competitive RT-PCR using cRNA internal standards: identity, quantity, and control. **BioTechniques**, v.32, n.6, p.1412-1414, 2002.

McORIST, A.L.; JACKSON, M.; BIRD, A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.50, p.131-139, 2002.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C.R.; PILATI, P.; NITTI, D.; MARINCOLA, F.M. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends in Molecular Medicine**, v.9, n.5, p.189-195, 2003.

MOLECULAR BEACONS. UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY. Public Health Research Institute. **Molecular beacons**. Disponível em : <http://www.molecular-beacons.org/>. Acesso em : 06 mar. 2008.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. MMWR. OLSEN, S.J.; MACKINNON, L.C.; GOULDING, J.S.; BEAN, N.H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **MMWR. CDC. Surveillance Summaries: Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, n.1, p.1-51, 2000. Disponível em: <http://www.cdc.gov/MMWR/PREVIEW/MMWRHTML/ss4901a1.htm>. Acesso em: 08 dez. 2007.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. MMWR. PRELIMINARY FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - selected sites, United States, 2003. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.53, n.16, p.338-343, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5316a2.htm>. Acesso em: 08 dez. 2007.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. MMWR. PRELIMINARY FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.56, n.14, p.336-339, 2007. Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm?s_cid=mm5614a4_e. Acesso em: 08 dez. 2007.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. MMWR. PRELIMINARY FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2007. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.57, n.14, p.336-370, 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5714a2.htm>. Acesso em: 08 dez. 2007.

MORIYA, Y.; NAKAMURA, T.; OKAMURA, N.; SAKAEDA, T.; HORINOUCI, M.; TAMURA, T.; AOYAMA, N.; KASUGA, M. OKUMURA, K. Comparison of synthetic DNA templates with automated cDNA templates in terms of quantification by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.3, p. 535, 2006.

NOCKER, A.; CHEUNG, C-Y. CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, p.310-320, 2006.

NOGVA, H.K.; DRØMTORP, S.M.; NISSEN, H.; RUDI, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **BioTechniques**, v.34, n.4, p.804-813, 2003.

NORTON, D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal AOAC International**, v.85, n.2, p.505-515, 2002.

O'GRADY, J.O.; SEDANO-BALBÁS, S.; MAHER, M.; SMITH, T.; BARRY, T. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food

samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.75-84, 2008.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.36, n.5, p.255-269, 1998.

PARADIS, S.; BOISSINOT, M.; PAQUETTE, N.; BÉLANGER, S.D. ; MARTEL, E. A. ; BOUDREAU, D.K. ; PICARD, F.J. ; QUELLETTE, M. ; ROY, P.H. ; BERGERON, M.G. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2013-2025, 2005.

PARK, H.J.; KIM, H.J.; PARK, S.H.; SHIN, E.G.; KIM, J.H.; KIM, H.Y. Direct and quantitative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using real-time PCR from artificially contaminated chicken meat. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.8, p.1453-1458, 2008.

PATEL, J.R.; BHAGWAT, A.A.; SANGLAY, G.C.; SOLOMON, M.B. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. **Food Microbiology**, v.23, p.39-46, 2006.

PERELLE, S.; DILASSER, F.; MALORNY, B. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.409-420, 2004.

POPOFF; M.Y. & Le MINOR, L. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th edition**. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France, 1997.

POPOFF; M.Y. & Le MINOR, L. Genus XXXIII *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. eds, **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc.p.764-799, 2005.

QIAGEN. **DNeasy[®] Blood & Tissue Handbook**. Hilden: Qiagen, 2006. Disponível em: www1.qiagen.com/HB/DNeasyBloodTissueKit_EN. Acesso em: 02 jan. 2006.

QIAGEN. **QIAamp[®] DNA Stool Handbook**. Hilden: Qiagen, 2007. Disponível em: www1.qiagen.com/HB/QIAampDNASToolMini. Acesso em: 02 set. 2007.

QIAGEN. **QIAquick[®] Multiwell PCR Purification Handbook**. Hilden: Qiagen, 2003. Disponível em: www1.qiagen.com/HB/QIAquickPCRPurificationKit_EN. Acesso em: 02 set. 2007.

QIAGEN. **RNAprotect[®] Bacteria Reagent Handbook**. Hilden: Qiagen, 2005. Disponível em: www1.qiagen.com/HB/RNAprotectBacteriaReagent. Acesso em: 02 set. 2006.

QIAGEN. **RNeasy[®] Mini Handbook**. Hilden: Qiagen, 2006. Disponível em: www1.qiagen.com/HB/RNeasyMiniKit_EN. Acesso em: 02 jan. 2006.

RÅDSTRÖM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; LÖVENKLEV, M. LÖFSTRÖM, C.

Pre-PCR processing. **Molecular Biotechnology**, v.26, n.2., p.133-146, 2004.

RAMOS-PAYÁN, R.; AGUILAR-MEDINA, M.; ESTRADA-PARRA, S.; GONZÁLEZ-y-MERCHAND, J.A.; FAVILA-CASTILLO, L.; MONROY-OSTRIA, A.; ESTRADA-GARCIA, I.C.E. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR® Green I. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, p.439-445, 2003.

RIJPENS, N.; JANNES, G.; HERMAN, L. Messenger RNA-based RT-PCR detection of viable *Salmonella*. **International of Dairy Journal**, v.12, p.233-238, 2002.

ROBBINS, R.C. JAYKUS, L-A; GEBREYES, W.A. Comparison of quantitative, real-time PCR to most probable number method for *Salmonella* Typhimurium DT 104 from swine feces. In: IAFP ANNUAL MEETING, 94, Lake Buena Vista, 2007. **Program and Abstract Book**, Lake Buena Vista, 2007. p3-34.

SAILS, A.D.; BOLTON, F.J.; FOX, A.J.; WAREING, D.R.A.; GREENWAY, D.L.A. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. **Molecular and Cellular Probes**, v.12, p.317-322, 1998.

SAILS, A.D.; FOX, A.J.; BOLTON, F.J.; WAREING, D.R.A.; GREENWAY, L.A. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1383-1390, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: A laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1659p.

SEO, K.H.; VALENTIN-BON, I.E.; BRACKETT, R.E.; HOLT, P.S. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v.67, p. 864-869, 2004.

SEO, K.H.; VALENTIN-BON, I.E.; BRACKETT, R.E. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods. **Journal of Food Protection**, v.69, n.3, p. 639-643, 2006.

SHARMA, V.K. Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular and Cellular Probes**, v.20, p. 298-306, 2006.

SCHELOBOLINA, 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 and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SHERIDAN, G.E.C.; MASTERS, C.I.; SHALLCROSS, J.A.; MACKEY, B.M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p.1313-1318, 1998.

SHERIDAN, G.E.C.; SZABO, E.A.; MACKEY, B.M. Effects of post-treatment holding conditions on detection of *tufA* mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: implications for RT-PCR-based indirect viability tests. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.6, p.375-379, 1999.

SHIAO, Y-H. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification. **BMC Biotechnology**, v.3, p.22, 2003.

SCHUURMAN, T.; de BOER, R.; PATTY, R.; KOOISTRA-SMID, M.; van ZWET, A. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5' – nuclease assay. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, n.3, p.238-245, 2005.

SCHUURMAN, T.; de BOER, R.F.; van ZANTEN, E.; van SLOCHTEREN, K.R.; SCHEPER, H.R.; DIJK-ALBERTS, B.G.; MÖLLER, A.V.M.; KOOISTRA-SMID, A.M.D. Feasibility of a molecular screening method for detection of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in a routine community-based clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.11, p.3692-3700, 2007.

SECRETARIA DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.5, n.6, p.1-7, 2005.

SZABO, E.A.; MACKEY, B.M. Detection of *Salmonella* Enteritidis by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.113-122, 1999.

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. *Salmonellae* and food safety. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.1, p.53-83, 1995.

VAITILINGOM, M.; GENDRE, F.; BRIGNON, P. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcription PCR in contaminated milk samples after heat treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.11157-1160, 1998.

van der ZEE, H.; HUIS in't VELD, H.J. Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A., eds. ***Salmonella* in domestic animals**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. Cap.22, p.373-391.

VANDENBERG, N.; van OORSCHOT, R.A.H. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n.5, p.993-995, 2002.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, P. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. **Journal of Food Protection**, v.70, n.6, p. 1366-1372, 2007.

WARD, L.R. *Salmonella*-the last fifty years. In: 13th INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA AND SALMONELLOSIS, Saint-Malo. **Program and Abstract Book**. Saint-Malo, 2006. Sessão I.

WEISS, J. H.; TAN, S.S.; MARTIN, B.K.; WITTEWER, C.T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, v.8, p.263-264, 1992.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and Projects. Media Centre. Fact Sheet. *Salmonella*: Drug-resistant *Salmonella*. **Drug-resistant *Salmonella***. Revised April 2005. (Fact Sheet n.139). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 24 mai. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Programmes and Projects. Media Centre. Fact Sheet. **Food safety and foodborne illness**. Disponível em: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/Report_AnimalFeed_Oct07.pdf. Acesso em: 12 nov. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH., **Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases**. 72p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.9.pdf. Acesso em: 12 nov. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Programmes and Projects Zoonoses and Veterinary Public Health. **Veterinary public health**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/vph/en/>. Acesso em: 24 mai. 2008.

WOLFFS, P.F.G; GLENCROSS, K.; NORLING, B.; GRIFFITHS, M.W. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, n.1, p.50-54, 2007.

WOLFFS, P.F.G.; GLENCROSS, K.; THIBAudeau, R.; GRIFFITHS, M.W. Direct quantitation and detection of *Salmonellae* in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p.3896-3900, 2006.

WOLFFS, P.; KNUTSSON, R.; NORLING, B.; RÅDSTRÖM, P. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1042-1047, 2004.

WOLFFS, P.; NORLING, B.; HOORFAR, J.; GRIFFITHS, M.; RÅDSTRÖM, P. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by flotation prior to real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.5759-5764, 2005a.

WOLFFS, P.; NORLING, B.; RÅDSTRÖM, P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, p.315-323, 2005b.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, n.1, p.75-85, 2005.

YU, Z. ; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **Biotechnology**, v.36, n.5, p.808-812, 2004.

ZUURMOND, A.-M. ; RUNDLÖF ; A.-K ; KRAAL, B. Either of the chromosomal *tuf* genes of *E. coli* K-12 can be deleted without loss of cell viability. **Molecular and General Genetics**, v.260, p.603-607, 1999.

7. ANEXOS

A.

B.

cont.

Anexo I. Comportamento da curva padrão de *S. Typhimurium* (BB441) obtida nas quantificações (A, B, C e D) por PCR-RT empregando DNA purificado de *Salmonella* artificialmente inoculada em fezes suínas.

C.

D.

Comportamento da curva padrão de *S. Typhimurium* (BB441) obtida nas quantificações (A, B, C e D) por PCR-RT empregando DNA purificado de *Salmonella* artificialmente inoculada em fezes suínas.

Anexo II. Localização e seqüência (vermelho) do *primer forward* (*tuf*-5F) desenvolvido neste estudo para detectar e quantificar *Salmonella* sp. Posições são baseadas num alinhamento múltiplo usando 58 seqüências do gene *tuf* de acordo com Paradis et. al. (2005). Acesso no GenBank em 14/08/06.

Organismo	Nr. acesso	Seqüência
		370
<i>Cedecea davisae</i>	AX 109284	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Cedecea lapagei</i>	AX 109286	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCGTTAAAGTTGGGCGAAGAAGTA
<i>Cedecea neteri</i>	AX 109285	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCGTTAAAGTTGGGCGAAGAAGTA
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	AX 109291	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Citrobacter braakii</i>	AX 109292	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Citrobacter farnei</i>	AX 109294	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Citrobacter freundii</i>	AX 109295	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Citrobacter koseri</i>	AX 109293	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Citrobacter sedlakii</i>	AX 109296	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Citrobacter werkmanii</i>	AX 109297	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Citrobacter youngae</i>	AX 109298	TCGTGGTACC GTTGT TACTGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	AX 109313	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Edwardsiella tarda</i>	AX 109314	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AX 109316	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Enterobacter amnigenus</i>	AX 109318	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Enterobacter asburiae</i>	AX 109319	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	AX 109320	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Enterobacter cloacae</i>	AX 109321	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Enterobacter gergoviae</i>	AX 109322	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Enterobacter hormaechei</i>	AX 109323	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Enterobacter sakazakii</i>	AX 109324	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Escherichia coli</i> 1	AX 110241	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Escherichia coli</i> 2	AX 110242	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Escherichia coli</i> 3	AX 110239	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Escherichia coli</i> 4	AX 110240	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Escherichia fergusonii</i>	AX 109346	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Escherichia hermannii</i>	AX 109347	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Escherichia vulneris</i>	AX 109348	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAARGTGKGGTGAAGAAGTT
<i>Kl. pneu.</i> subs. <i>. ozaenae</i>	AX 109369	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Kl. pneu.</i> subs. <i>. rhinoscleromatis</i>	AX 109371	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Kluyvera ascorbata</i>	AX 109372	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGYGAAGAAGTT
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	AX 109373	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Kluyvera georgiana</i>	AX 109374	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Leclercia adacarboxylata</i>	AX 109377	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Leminorella grimontii</i>	AX 109380	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGCATCATCAAAGTCGGTGAAGAAGTG
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109401	CCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTTAGCGCGGCATCGTTAAAGTCGGCGACGAAGTT
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109317	TCGCGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATYAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Routella ornithinolytica</i>	AY 134479	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Routella planticola</i>	AX 109368	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Salmonella bongori</i>	AY 134478	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>. arizonae</i>	AX 109425	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>. diarizonae</i>	AX 109427	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>. houtenae</i>	AX 109429	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>. indica</i>	AX 109430	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>. salamae</i>	AX 109431	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	AX 109426	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Enteritidis</i>	AX 109998	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Paratyphi A</i>	AX 109879	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Paratyphi B</i>	AX 110000	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Typhi</i>	AX 109432	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Typhimurium</i>	AX 111148	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Virchow</i>	AX 110001	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTT
<i>Shigella boydii</i>	AX 109439	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Shigella dysenteriae</i>	AX 109440	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Shigella flexneri</i>	AX 109441	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Shigella sonnei</i>	AX 109442	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAACGCGGTATCATCAAAGTTGGTGAAGAAGTT
<i>Trabulsiella guamensis</i>	AX 109500	TCGTGGTACC GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCATCAAAGTTGGGCGAAGAAGTA
<i>Yokenella regensburgi</i>	AX 109508	TCGTGGCACCG GTTGT TACCGGTCGTGTAGAGCGCGGTATCGTTAAAGTTGGGCGAAGAAGTT

430

Região delimitada no retângulo corresponde a seqüência do gene *tuf* de 13 salmonelas. Bases: guanina - G (verde); citosina - C (azul); timina - T (violeta) e adenina - A (rosa) destacadas diferem da seqüência homóloga de *Salmonella*. Letras inespecíficas R, K, Y (preto) não correspondem ao alinhamento múltiplo do programa DS Gene.

Anexo III. Localização e sequência (vermelho) da sonda *tuf*-MGB desenvolvida para detectar e quantificar *Salmonella* sp. Acesso no GenBank em 14/08/06.

Organismo	Nr. acesso	Sequência
		431
<i>Cedecea davisae</i>	AX 109284	GAAATCGTTGGTATC AAAGATACTGCGAAATC TACCTGTACCGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Cedecea lapagei</i>	AX 109286	GAAATCGTTGGTATC AAAGATACTGCGAAATC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Cedecea neteri</i>	AX 109285	GAAATCGTTGGTATC AAAGATACTGCGAAATC TACCTGTACCGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	AX 109291	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCCAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter braakii</i>	AX 109292	GAAATCGTTGGTATC AAAGACACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter farnei</i>	AX 109294	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCCAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter freundii</i>	AX 109295	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter koseri</i>	AX 109293	GAAATYGGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter sedlakii</i>	AX 109296	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter werkmanii</i>	AX 109297	GAAATCGTTGGTATC AAAGA CACCGCTAAGTC TACCTGTACCGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Citrobacter youngae</i>	AX 109298	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCCAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	AX 109313	GAAATCGTAGGTATC AAAGCCGACCAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Edwardsiella tarda</i>	AX 109314	GAAATCGTTGGTATC AAAGCCGACCCCAAGACC ACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AX 109316	GAAATCGTTGGTATC AAAGACACCGCGAAAC CCACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter amnigenus</i>	AX 109318	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter asburiae</i>	AX 109319	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	AX 109320	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCKAAATC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter cloacae</i>	AX 109321	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter gergoviae</i>	AX 109322	GAAATCGTTGGTATC AAAGA CACCGCGAAAC CCACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter hormaechei</i>	AX 109323	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Enterobacter sakazakii</i>	AX 109324	GAAATCGTGGGCATC AAAGA CACCGCGAAATC ACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia coli</i> 1	AX 110241	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia coli</i> 2	AX 110242	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia coli</i> 3	AX 110239	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia coli</i> 4	AX 110240	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia fergusonii</i>	AX 109346	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia hermannii</i>	AX 109347	GAAATCGTGGGTATC AAAGATACTGCGAAATC ACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Escherichia vulneris</i>	AX 109348	GAAATCGTGGGTATC AAAGATACTGCGAAATC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Kl. pneu.</i> subs. <i>ozaenae</i>	AX 109369	GAAATCGTTGGTATC AAAGAAACCGCGAAAC CCACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Kl. pneu.</i> subs. <i>rhinoscleromatis</i>	AX 109371	GAAATCGTTGGTATC AAAGAAACCGCGAAAC CCACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Kluyvera ascorbata</i>	AX 109372	GAAATCGTTGGTATC AAAGACACCGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	AX 109373	GAAATCGTGGGTATC AAAGACACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Kluyvera georgiana</i>	AX 109374	GAAATCGTTGGTATC AAAGACACCGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	AX 109377	GAAATCGTTGGTATC AAAGACACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Leminorella grimontii</i>	AX 109380	GAAATCGTGGGTATC AAAGATACCCCAAGACC ACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGT
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109401	GAAATCGTGGGTATC AAAGATACTGCGAAATC ACCTGTACTGGCGTTGAGATGTTCCGT
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109317	GAAATCGTTGGTATC AAAGATACYCGGAAATC ACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Routella ornithinolytica</i>	AY 134479	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Routella planticola</i>	AX 109368	GAAATCGTTGGTATC AAAGATACTGCTAARTC WACCTGTACTYGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Salmonella bongori</i>	AY 134478	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>arizonae</i>	AX 109425	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>diarizonae</i>	AX 109427	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>houtenae</i>	AX 109429	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC GACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>indica</i>	AX 109430	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> subs. <i>salamae</i>	AX 109431	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Choleraesuis</i>	AX 109426	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Enteritidis</i>	AX 109998	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Paratyphi A</i>	AX 109879	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Paratyphi B</i>	AX 110000	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Typhi</i>	AX 109432	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Typhimurium</i>	AX 111148	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Sal . chol.</i> serovar <i>Virchow</i>	AX 110001	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Shigella boydii</i>	AX 109439	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Shigella dysenteriae</i>	AX 109440	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Shigella flexneri</i>	AX 109441	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Shigella sonnei</i>	AX 109442	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTCAGAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC
<i>Trabulsiella guamensis</i>	AX 109500	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCGAAGTC ACCTGTACTGGCGTAGAAATGTTCCGC
<i>Yokenella regensburgei</i>	AX 109508	GAAATCGTTGGTATC AAAGAGACTGCTAAGTC TACCTGTACTGGCGTTGAAATGTTCCGC

Região delimitada no retângulo corresponde a sequência do gene *tuf* de 13 salmonelas. Bases: guanina - G (verde); citosina - C (azul); timina - T (violeta) e adenina - A (rosa) destacadas diferem da sequência homóloga de *Salmonella*. Letras inespecíficas R, K, Y (preto) não correspondem ao alinhamento múltiplo do programa DS Gene.

Anexo IV. Localização e sequência (vermelho) do *primer reverse* (*tuf*-6R) desenvolvido para detectar e quantificar *Salmonella* sp. Acesso no GenBank em 14/08/06.

Organismo	Nr. acesso	Sequência
		491
<i>Cedecea davisae</i>	AX 109284	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Cedecea lapagei</i>	AX 109286	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Cedecea neteri</i>	AX 109285	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	AX 109291	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter braakii</i>	AX 109292	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter farnei</i>	AX 109294	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter freundii</i>	AX 109295	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter koseri</i>	AX 109293	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter sedlakii</i>	AX 109296	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter werkmanii</i>	AX 109297	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Citrobacter youngae</i>	AX 109298	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	AX 109313	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Edwardsiella tarda</i>	AX 109314	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AX 109316	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter amnigenus</i>	AX 109318	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter asburiae</i>	AX 109319	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	AX 109320	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter cloacae</i>	AX 109321	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter gergoviae</i>	AX 109322	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter hormaechei</i>	AX 109323	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Enterobacter sakazakii</i>	AX 109324	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia coli</i> 1	AX 110241	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia coli</i> 2	AX 110242	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia coli</i> 3	AX 110239	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia coli</i> 4	AX 110240	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia fergusonii</i>	AX 109346	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia hermannii</i>	AX 109347	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Escherichia vulneris</i>	AX 109348	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>KL. pneu. subs. ozaenae</i>	AX 109369	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>KL. pneu. subs. rhinoscleromatis</i>	AX 109371	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Kluyvera ascorbata</i>	AX 109372	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	AX 109373	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Kluyvera georgiana</i>	AX 109374	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Leciercia adacarboxylata</i>	AX 109377	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Leminorella grimontii</i>	AX 109380	AAGCTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109401	AAGCTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Pantoea agglomerans</i>	AX 109317	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Routella ornithinolytica</i>	AY 134479	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Routella planticola</i>	AX 109368	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Salmonella bongori</i>	AY 134478	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. subs. arizonae</i>	AX 109425	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. subs. diarizonae</i>	AX 109427	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. subs. houtenae</i>	AX 109429	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. subs. indica</i>	AX 109430	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. subs. salamae</i>	AX 109431	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Choleraesuis</i>	AX 109426	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Enteritidis</i>	AX 109998	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Paratyphi A</i>	AX 109879	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Paratyphi B</i>	AX 110000	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Typhi</i>	AX 109432	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Typhimurium</i>	AX 111148	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Sal. chol. serovar Virchow</i>	AX 110001	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Shigella boydii</i>	AX 109439	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Shigella dysenteriae</i>	AX 109440	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Shigella flexneri</i>	AX 109441	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Shigella sonnei</i>	AX 109442	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Trabulsiella guamensis</i>	AX 109500	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC
<i>Yokenella regensburgei</i>	AX 109508	AAACTGCTGGACGAAGGCCGTGCTGGTGAGAACGTTGGTGTTC

Região delimitada no retângulo corresponde a sequência do gene *tuf* de 13 salmonelas. Bases: guanina - G (verde); citosina - C (azul); timina - T (violeta) e adenina - A (rosa) destacadas diferem da sequência homóloga de *Salmonella*. Letra inespecífica Y (preto) não corresponde ao alinhamento múltiplo do programa DS Gene.

A.

B.

Anexo V. Comportamento de *S. Typhimurium* BB441 (A) e 51K61 (B) obtido por PCR-RT empregando-se os valores médios de UFC eq do DNA com os respectivos C_t médios.

A.

B.

Anexo VI. Comportamento de *S. Typhimurium* BB441 (A) e 51K61 (B) obtido por RT-PCR-RT empregando-se os valores médios de UFC eq do RNA com os respectivos C_t médios.

A.

B.

cont.

Anexo VII. Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população elevada de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

cont. anexo VII

C.

D.

Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população elevada de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

A.

B.

cont.

Anexo VIII. Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo suíno inoculado com população elevada de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

cont. anexo VIII

C.

D.

Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo suíno inoculado com população elevada de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

A.

B.

cont.

Anexo IX. Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população baixa de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

cont. anexo IX

C.

D.

Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo ave inoculado com população baixa de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

A.

B.

cont.

Anexo X. Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo suíno inoculado com população baixa de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.

cont. anexo X

C.

D.

Relação entre UFC eq e número de ciclos (C_t) para alimento-modelo suíno inoculado com população baixa de *S. Typhimurium* (51K61). A e B – dados obtidos por RT-PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente. C e D – dados obtidos por PCR-RT para amostras incubadas a 20 °C e 8 °C, respectivamente.