

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Eduarda Boff Martelo**

**Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real em  
amostras de abatedouros avícolas**

**Passo Fundo**  
**2016**

## CIP – Catalogação na Publicação

---

M376d Martelo, Eduarda Boff  
Detecção e quantificação de Salmonella spp. por PCR  
em tempo real em amostras de abatedouros avícolas /  
Eduarda Boff Martelo. – 2016.  
77 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2016

1. Salmonela. 2. Frango de corte - Doenças. 3. Indústria  
avícola. 4. Alimentos - Contaminação. I. Santos, Luciana  
Ruschel dos, orientadora. II. Título.

CDU: 637.5.03

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues  
Domingues - CRB 10/1569

**Eduarda Boff Martelo**

**Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real em  
amostras de abatedouros avícolas**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos

Orientador: Profª. Dra. Luciana Ruschel dos  
Santos

**Passo Fundo**

**2016**

**Eduarda Boff Martelo**

**Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real em amostras de abatedouros avícolas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos

**Passo Fundo**

**2016**





**Eduarda Boff Martelo**

**Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real em amostras de abatedouros avícolas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos

Passo Fundo, 08 de abril de 2016.

Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos – UPF – Orientadora

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues – UPF

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Benito Brito – FEPAGRO





**Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha orientadora e à minha família, pelo apoio, incentivo e carinho. Muito obrigada.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo em cada momento de minha vida.

Aos meus pais, Irdes e Adecir, por todo o apoio e carinho, e aos quais devo todas as minhas conquistas.

A minha irmã Valquíria, pelo carinho, amizade, apoio e ajuda.

Ao meu namorado Maico pelo apoio, carinho e amor.

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realização desse curso e pelo aprendizado.

À Professora Luciana Ruschel dos Santos, orientadora, por acreditar na minha capacidade, pela ajuda valiosa, pela dedicação e orientação. Obrigada por estar sempre ao meu lado, és um exemplo profissional e pessoal para mim.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, pela ajuda e ensinamentos.

Ao Professor Rafael Frandoloso, pelo empenho, dedicação e ajuda para realização do método de PCR em tempo real do projeto, sem você não seria possível.

A Mestra Isabel Cisco pela ajuda e dedicação incansável para que esse projeto pudesse ser realizado. Obrigada, Isa.

A bolsista de iniciação científica Denise Tedesco pela constante ajuda na realização desse trabalho, pelo apoio e amizade.

A todos os professores Doutores que compõe o grupo de docentes do programa PPGCTA.

Aos colegas de mestrado: Ana Cláudia, Ellen, Luana, Josiane, Bruna, Creciana, Graziela, Amauri e Silvio pela amizade, apoio e ajuda. Vocês foram fundamentais para a conclusão desse projeto.

Aos colegas de laboratório e mestrandos: Emanuele, Sara, Raíssa, Nyelle, Bruna, Juliana, Willian, Alana. Pelo apoio e amizade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.



*Epígrafe*

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*



## RESUMO

O gênero *Salmonella* é responsável por uma zoonose conhecida como salmonelose e o consumo de produtos de origem avícola é implicado como uma das principais fontes de infecção para humanos. A associação entre *Salmonella* spp. em aves e enterites em humanos decorre da persistência do agente no *habitat* do frango de corte, que proporciona a colonização intestinal assintomática na ave, enquanto o manuseio incorreto de carnes cruas e o consumo de carnes mal cozidas são fatores de risco para as doenças transmitidas por alimentos. Métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis e específicos, que permitam não apenas a detecção, mas também a quantificação da bactéria são necessários tanto para a indústria alimentícia quanto para as agências reguladoras e a PCR em tempo real é uma alternativa aos métodos convencionais para estimar *Salmonella* spp. Neste trabalho utilizou-se a PCR em tempo real para identificar e quantificar a contaminação por *Salmonella* spp. desde a chegada dos frangos de corte até os produtos finais em abatedouros sob Inspeção Federal. As amostras foram oriundas de diferentes pontos da tecnologia de abate previamente coletados e considerados positivos para *Salmonella* por técnicas microbiológicas: microbiologia convencional (MC) e Número Mais Provável miniaturizado (mNMP), o que configurava o lote como positivo para o agente. Foram avaliadas 139 amostras em 5 lotes, das quais 27 (19%) foram positivas por MC e mNMP e 68 (49%) por PCR em tempo real, configurando a sensibilidade da técnica. Dentro dos lotes, a contaminação variou de 1,93 log<sub>10</sub> UFC/mL até 7,99 log<sub>10</sub> UFC/mL, sendo a maior verificada em *swab* de gaiola de transporte após higienização (7,99 log<sub>10</sub> UFC/mL) e a menor em carcaça congelada a -12°C por 24 horas (1,93 log<sub>10</sub> UFC/mL). Estes resultados permitem inferir que a contaminação por *Salmonella* spp. nos abatedouros é variável, mas que geralmente as aves chegam ao abatedouro com um nível de contaminação que é diminuído ao longo da tecnologia de abate, ressaltando a importância da biossegurança nas granjas e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação nos abatedouros.

Palavras-chave: PCR em tempo real, *Salmonella* spp., frangos de corte, abatedouros.





## ABSTRACT

The genus *Salmonella* is responsible for a zoonosis known as salmonellosis and consumption of poultry products is implicated as a major source of infection for humans. The association between *Salmonella* spp. in poultry and enteritis in humans arises from the persistence of the agent in broiler habitat, which provides the asymptomatic intestinal colonization in the bird while the improper handling of raw meat and the consumption of undercooked meats are risk factors for foodborne illness. Methods for rapid diagnosis, sensitive and specific, allowing not only detecting but also the quantification of bacteria are required for both the food industry and for the regulators and real time PCR is an alternative to conventional methods for estimating *Salmonella*. In this work we used real-time PCR to identify and quantify contamination by *Salmonella* spp. since the arrival of poultry to the final product in slaughterhouses under federal inspection. The selected samples were previously collected from different parts of the slaughter technology and considered positive for *Salmonella* by microbiological techniques: conventional microbiology (CM) and miniaturized Most Probable Number (mMPN), which configured the batch as positive for the agent. Were evaluated 139 samples in 5 batches, of which 27 (19%) were positive by conventional microbiology and mMPN and 68 (49%) by real-time PCR, setting the sensitivity of the technique. Within batch contamination varies from 1.93 log<sub>10</sub> CFU / mL to 7.99 log<sub>10</sub> CFU / mL, and most contamination was tested in a collecting cage after its cleaning swab (7.99 log<sub>10</sub> CFU / mL) and the least contamination was found in a frozen carcass at -12°C to 24 hours (1.93 log<sub>10</sub> CFU / mL). These results allow inferring that contamination by *Salmonella* spp. in slaughterhouses is variable, but generally, the poultry arrive at the slaughterhouse with a level of contamination that is reduced along the slaughter technology, emphasizing the importance of biosecurity at the farms and the application of good manufacturing practices in slaughterhouses.

Key-words: Real time PCR, *Salmonella* spp., poultry, slaughterhouses.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Plataforma de instrumentação para reação em cadeia pela polimerase em tempo real (Fabricante Qiagen ®).....	37
Figura 2 - Gráfico representando a amplificação de dois genes.....	38
Figura 3 - Fluorescência verde do SYBR® Green quando ligado ao dsDNA. ....	40
Figura 4 - Ilustração de uma sonda TaqMan®. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 5 - Curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real com <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028. ....	49



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Relação dos pontos de coleta e suas contaminações provenientes da coleta 1 (15). .....	53
Gráfico 2 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 2 (Coleta 20). .....	54
Gráfico 3 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 3 (Coleta 19). .....	55
Gráfico 4 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 4 (Coleta LA). .....	56
Gráfico 5- Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 5 (Coleta LF). .....	58



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Pontos e forma de coleta de amostras em diferentes etapas da tecnologia de abate de frangos de corte.....	43
Quadro 2 - Programação do equipamento <i>Rotor- Gene Q</i> para a reação de PCR em tempo real. ....	46
Quadro 3 - Valores de <i>Ct</i> relativos as contagens em UFC/mL e conversão para log 10UFC/mL das diluições de 10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>-7</sup> de <i>Salmonella Typhimurium</i> utilizadas para construção da curva padrão de PCR em tempo real. ....	50
Quadro 4 - Relação de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp. em cinco lotes avaliados por Microbiologia Convencional (MC), Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) e PCR em tempo real. ....	50









## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>288</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>300</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. E A SAÚDE PÚBLICA .....</b>	<b>30</b>
2.1.1	<i>Salmonella</i> spp. na Tecnologia de Abate de Frangos de Corte .....	32
<b>2.2</b>	<b>MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA <i>Salmonella</i> spp. ....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Isolamento Microbiológico Convencional .....	33
2.2.2	Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. ....	35
2.2.3	Técnica de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) .....	36
2.2.4	PCR em Tempo Real .....	37
2.2.4.1	<i>O principio.....</i>	39
2.2.4.2	<i>Método SYBR® Green.....</i>	39
2.2.4.3	<i>Método TaqMan® .....</i>	40
2.2.4.4	<i>Aplicações na pesquisa em alimentos .....</i>	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>433</b>
<b>3.5</b>	<b>AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real .....	44
3.5.2	Extração de DNA genômico para determinação da curva padrão.....	45
3.5.3	Amplificação de <i>Salmonella</i> Typhimurium para determinação da curva padrão ....	45
3.5.4	Extração de DNA das amostras avaliadas .....	46
<b>3.6</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>AMPLIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR PCR EM TEMPO REAL .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>610</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>631</b>
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>697</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos constituem uma preocupação mundial em saúde pública e o risco da disseminação destas doenças está vinculado a diversas razões, como adaptação microbiana, mudanças nos sistemas de produção de alimentos e de criação de animais, hábitos alimentares, estilo de vida e comportamento da população, mudanças na demografia humana e nos processos produtivos e tecnologia de alimentos (CAC, 2007). A Sociedade é cada vez mais exigente, e para satisfazer o consumidor quer em qualidade quer em segurança alimentar, a legislação em vigor deve ser cumprida com rigor, de forma a garantir que os produtos da origem até ao consumo sejam alimentos seguros (RODRIGUES *et al.*, 2015).

A cadeia avícola é atualmente um dos mais importantes componentes do agronegócio brasileiro e seu consumo *per capita* vem aumentando gradativamente. Nos anos de 2000 a 2013, aumentou de 29,91 para 47,38 Kg e em 2013 foi de 41,8 Kg (UBABEF, 2014). Do volume total de carne de frango produzida, 68,4% é destinada ao consumo interno e 31,6% a exportação. O aumento do consumo desta carne fez a indústria intensificar a produção e a tecnologia de abate, que ao tempo em que possibilita o abate de milhares de frangos também pode potencializar contaminações bacterianas oriundas das granjas.

Segundo Oliveira *et al.* (2004), para garantir essa produtividade, é necessário um crescimento racional que vise além de outros fatores, a qualidade do produto avícola. Para isso, o governo federal adota planos sanitários que objetivam controlar enfermidades que causam, além de prejuízos econômicos para os produtores, transtornos à saúde pública. As medidas gerais de profilaxia e as normas de biossegurança empregadas na avicultura industrial, bem como nas criações alternativas, dificultam mas não impedem a presença de microrganismos patogênicos, dentre os quais destacam-se as salmonelas. Os produtos avícolas brasileiros são competitivos no mercado externo e as que bactérias do gênero *Salmonella* spp. são uma barreira sanitária para as exportações. O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e encontra-se amplamente difundido na natureza, tendo como principais reservatórios o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente.

A quantificação da contaminação por *Salmonella* desde as granjas até o abatedouro é fundamental para se estimar a extensão da contaminação nos cortes e carcaças de frangos e avaliar a efetividade das boas práticas de produção adotadas nas empresas para controle deste patógeno nos produtos finais. (COLLA *et al.*, 2011).

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR em tempo real) é uma modificação da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. Neste sistema a amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado (MARRAS, 2008). Esta técnica pode representar uma forma mais rápida e precisa para a identificação e quantificação de microrganismos em comparação com os métodos microbiológicos tradicionais de isolamento e quantificação, como a microbiologia convencional e quantificação por séries de tubos, denominada Número Mais Provável (NMP), ou por métodos miniaturizados como o Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) (MADIGAM *et al.*, 2010).

Desta forma, a técnica de PCR em tempo real foi empregada para identificar e quantificar *Salmonella* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte e assim mapear os pontos onde pode ocorrer aumento ou redução de uma provável contaminação inicial por esta bactéria.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *Salmonella* spp. E A SAÚDE PÚBLICA

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae, que possui mais de 25 gêneros bacterianos, incluindo um grande número de patógenos, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros. Estudos genéticos estimam que os genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica* possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA, sugerindo que estas espécies tenham derivado de um ancestral comum, há 100 milhões de anos (JONG *et al.*, 2010).

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo e foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon. A *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos e com formato de bastonetes curtos. A maioria das espécies são móveis (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), com flagelos peritríquios. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Possuem como temperatura ótima de crescimento aproximadamente 38°C e a temperatura mínima em torno de 5°C. São relativamente termos sensíveis, podendo ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002).

Sua classificação reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta com seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. No ano 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas. Os sorovares devem ser escritos com a primeira letra maiúscula, ou seja, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, denominada comumente *S. Enteritidis* (FORSYTHE, 2002; GRIMONT *et al.*, 2007).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos é um problema de saúde pública relacionado a graves intoxicações alimentares, sendo a principal responsável por vários surtos ao redor do mundo (WHO, 2013).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria cosmopolita e ubíqua com capacidade de colonizar a maioria dos vertebrados, incluindo mamíferos, aves e répteis. Alimentos contaminados, água

e meio ambiente também são fontes comuns de infecção para animais e homem. Alimentos destinados à produção animal, como farinha de peixe, farinha de osso, farinha de carne e leite podem ser fontes potenciais do micro-organismo (LÁZARO, 2008; LIBBY, 2004).

Os alimentos podem sofrer contaminações em todas as etapas nas quais são elaborados e mesmo após, quando chegam ao consumidor final. Essas contaminações podem intoxicar milhões de pessoas anualmente, o que é considerado uma causa significativa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (FLORES *et al.*, 2015). Quando estes produtos são consumidos sem passar por um processo adequado de cozimento podem atuar como fonte de transmissão da bactéria para os humanos. Alimentos como pratos prontos para consumo e saladas também atuam como disseminadores da bactéria (WELKER *et al.*, 2010).

A salmonelose cursa com diarreia, cólicas, náusea e vômito, podendo evoluir, em casos graves, para septicemia, febre entérica, osteomielite e até morte. Os primeiros sintomas ocorrem entre 12 e 36 horas após a ingestão do alimento (GALDINO *et al.*, 2013). De acordo com o Centro de Controle de Prevenção de Doenças-CDC (2013), a salmonelose é uma das principais doenças entéricas em humanos em todo o mundo. Segundo Nascimento *et al.* (2011), a dose considerada infectante de *Salmonella* spp. em humanos sadios é de  $10^5$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC). Já em pacientes imunocomprometidos, a dose infectante é reduzida ( $\leq 10^3$ ) para alguns sorovares quando envolvidas em surtos de doenças de transmissão alimentar (DTA) (LAZARO, 2008)

No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, ocorreram 1.564 surtos de salmonelose entre os anos 2000 a 2013, totalizando 38% dos surtos por DTA (BRASIL, 2014). Alimentos à base de carne de frango e ovos foram os principais veículos deste micro-organismo, embora outros alimentos possam estar contaminados secundariamente (ZHAO *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2006) mostram que 25% das contaminações estão associadas à contaminação cruzada, envolvendo principalmente práticas de higiene deficientes tais como equipamentos contaminados, estocagem inadequada, e contaminação dos funcionários que manipulam esses produtos. Além do risco direto pela ingestão de alimentos contaminados, o tratamento inadequado da doença também pode afetar a saúde humana através de resíduos de antibióticos deixados na carne que podem causar alergias e até choques anafiláticos em humanos (TORTORA *et al.*, 2000).

### 1.1.1 *Salmonella* spp. na Tecnologia de Abate de Frangos de Corte

A microbiota da ave viva se encontra essencialmente na superfície externa, tegumentos cutâneos, no trato digestório e, em menor grau, no trato respiratório. A contaminação se dá inicialmente pela retenção das bactérias sobre a pele, a qual vai permitir que os microrganismos possam se aderir convenientemente. Devido à grande quantidade de nutrientes nas carcaças associada ao desenvolvimento microbiano, esta carne pode deteriorar-se em um curto espaço de tempo. O tipo e o número de micro-organismos presentes na carne refletem o grau de higiene do abatedouro, como também as condições de armazenamento após o abate dos animais (JAY *et al.*, 2005).

Em frangos, a presença de *Salmonella* no trato intestinal, na pele e entre as penas, pode causar a contaminação das carcaças durante o abate e o processamento disseminando assim o micro-organismo até os consumidores finais (DUARTE *et al.*, 2009). Nas aves a salmonelose é causada por *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, responsáveis por morbidade e mortalidade variáveis em galinhas e influenciadas pela idade, susceptibilidade à cepa, nutrição, manejo do lote e características de exposição. Entretanto, a morbidade é superior a mortalidade, sendo que algumas aves afetadas se recuperam espontaneamente da doença (POPOFF, 1997).

A carne de aves pode estar contaminada com *Salmonella* spp. se bactéria for transferida do conteúdo intestinal à carcaça durante o abate e processamento. Da mesma forma, as poedeiras podem contaminar os ovos no momento da postura ou ainda durante a formação do ovo (POPOFF, 1997) e um dos principais objetivos do abate de animais domésticos para consumo humano é a obtenção da carne com a menor contaminação possível (FORSYTHE, 2002).

Pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25g da amostra. Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do microrganismo para a ocorrência de doença em humanos. Esta quantidade, ou dose infectante, pode variar com o sorovar, com o estado de saúde e tolerância de cada indivíduo e ainda em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos à determinadas espécies animais (JAKABI *et al.*, 1999). Produtos refrigerados em temperatura de 2°C podem conter *Salmonella* spp., uma vez que possuem a capacidade de permanecer viáveis em produtos resfriados por longos períodos. Devido à sobrevivência de *Salmonella* spp. em baixas temperaturas, existe uma Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece normas para rotulagem de



produtos crus de carnes de aves, exigindo a obrigatoriedade de recomendações sobre o consumo desses alimentos cozidos, fritos ou assados completamente (BRASIL, 2002).

A Instrução Normativa nº 70 (BRASIL, 2003) visa conferir um controle minucioso sobre o abate e atender as exigências de segurança do alimento baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

## 1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA *Salmonella* spp.

Analisar amostras de alimentos para evidenciar a presença de bactérias patogênicas ou não é uma prática padrão para garantir a segurança e a qualidade do alimento (FORSYTHE, 2002). Além disso, a quantidade e o tipo de micro-organismo presentes em um determinado alimento refletem as condições sanitárias empregadas para a sua produção, assim como as condições atuais desse alimento (FREITAS, 2006). A interpretação dos resultados em microbiologia de alimentos é difícil porque os microrganismos estão em um ambiente dinâmico, podendo ocorrer à multiplicação ou morte destes, as contagens de células viáveis por meio de plaqueamento serem malconduzidas ou ainda o processamento de alimentos não apresentar uma boa homogeneidade, sendo difícil obter uma amostra representativa para todo o lote (FORSYTHE, 2002).

A detecção dos microrganismos em alimentos pode ocorrer por meios de métodos de cultivo tradicionais, seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas (SANTOS *et al.*, 2006). Segundo Forsythe (2002) os métodos devem ser confiáveis e dentre os protocolos certificados podem ser citados: *Association of Official Analytical Chemists, Bacteriological Analytical Manual; Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.*

### 2.2.1 Isolamento Microbiológico Convencional

O procedimento para detecção de *Salmonella* spp. é baseado principalmente na técnica microbiológica convencional, preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) e Organização Internacional de Epizootias (OIE). As fases de detecção de *Salmonella* sp. podem ser divididas em pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, semeadura em meio sólido seletivo,

triagem bioquímica, confirmação bioquímica e sorologia (OLIVEIRA, 2000). O número de *Salmonella* spp. presente no material a ser avaliado pode ser pequeno, o que dificulta o isolamento direto, e promover sua multiplicação é finalidade dos métodos enriquecedores (BRASIL, 1995).

Para Muller (1987), a etapa de enriquecimento seletivo permite o crescimento preferencial da *Salmonella* spp., inibindo o crescimento da microbiota competitiva, geralmente através de compostos tóxicos, pH e pressão osmótica. O caldo tetrionato é seletivo para *Salmonella* spp. pela reação entre o tiosulfato e a solução iodo, enquanto a adição de bile bovina e verde brilhante aumenta a seletividade do meio, inibindo a microbiota Gram-positiva e retardando o crescimento de outras Enterobactérias. O caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) é eficiente na recuperação de *Salmonella* spp. com alta seletividade, devido à capacidade de multiplicação da bactéria em pressões osmóticas elevadas, pH baixo e temperatura de 42°C (RAPPAPORT-VASSILIADIS, 1987).

A etapa de semeadura em meio sólido seletivo é feita a partir de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo e o Agar deverá apresentar seletividade que diminua o crescimento de bactérias competidoras não inibidas na etapa anterior além de um sistema indicador que permita diferenciar *Salmonella* spp. da microbiota acompanhante (SHERROD, 1995).

Dentre os ágaros seletivos para *Salmonella* podem ser citados MacConkey, Verde Brilhante com Novobiocina (BGN), Hektoen, Rambach e Xilose Tergitol 4 (XLT4). Esses meios permitem o crescimento de *Salmonella* spp. que se procura isolar inibindo a flora associada e, além de serem seletivos, são diferenciais, pois neles as colônias a serem estudadas apresentam caracteres que permitem diferenciá-las das não desejadas. Não existe um meio seletivo inteiramente satisfatório, já que nenhum atinge o ideal de eliminar todos os saprófitos, permitindo apenas o crescimento de *Salmonella* spp., por exemplo. Assim, deve-se utilizar, no mínimo, dois meios seletivo-indicadores devido às diferentes características nutricionais entre os sorovares de *Salmonella* (BRASIL, 1995 A).

Em continuidade ao isolamento em ágar repica-se, de cada uma das placas semeadas, entre 2 a 3 colônias com características de *Salmonella* spp. e realiza-se a confirmação bioquímica das colônias supostamente classificadas como *Salmonella* spp. Em caso de testes indicativos de *Salmonella* spp. realiza-se confirmação sorológica pela técnica de aglutinação com soro polivalente anti-O (MASSAGER, 2004).

### 2.2.2 Quantificação de *Salmonella* spp.

A quantificação de *Salmonella* spp. em alimentos não é uma prática rotineira. Entretanto, esta informação é desejável nas estratégias de redução de infecção alimentar, tanto na avaliação do risco microbiológico como na avaliação de substâncias e procedimentos para controle de *Salmonella* spp. em produtos (ESCARTIN, 1995). Frequentemente *Salmonella* spp., pode estar acompanhada de microrganismos interferentes, o que determina que o método de número mais provável (NMP) seja o mais indicado, em comparação a outras técnicas de contagem, já que etapas de enriquecimento em meios líquidos determinam uma maior eficiência de isolamento do microrganismo alvo (BOROWSKY, 2005).

O NMP é um método indireto de estimar a população bacteriana, baseado em probabilidades estatísticas, e a técnica pode ser combinada com vários processos de identificação de *Salmonella* spp. Assim, amostras de 25g de alimento, *swabs* ou água de enxágue podem ser associados (IZAT *et al.*, 1991). O NMP tem sido empregado para avaliar a qualidade microbiológica da água como potável ou não (MARQUESI, 2010), bem como estimar a contaminação de carcaças de frango para *Salmonella* spp. desta forma mensurando o risco em adquirir uma infecção alimentar (BORSOI *et al.*, 2010).

A técnica do NMP apresenta algumas vantagens em relação à contagem em placas, como a possibilidade de inocular quantidades maiores de amostras, aumentando proporcionalmente a quantidade do meio de cultura, oferecendo maior sensibilidade e flexibilidade no estabelecimento do limite de detecção. Outra vantagem seria permitir a introdução de etapas de recuperação de células injuriadas, utilizando um meio não seletivo para as etapas iniciais. No caso do NMP para *Salmonella* spp. ocorre uma adaptação de métodos qualitativos para quantitativos a partir de técnicas já validadas (SILVA *et al.*, 2007).

A contagem pelo NMP é realizada por diluições seriadas de amostras em meios de culturas apropriados incubados a temperaturas apropriadas e os tubos com crescimento positivo são submetidos a teste confirmatórios. O número de organismos na amostra original é determinado através de tabelas para estimativa de NMP, baseados no trabalho original de McCrady em 1915. Apesar da facilidade da execução e seleção de microrganismos através dos meios líquidos seletivos utilizados, o método não pode ser considerado preciso, sendo considerado na verdade, uma estimativa, já que os valores máximos e mínimos expressos nas tabelas de referência estão bastante distantes (JAY, 2005).

### 2.2.3 Técnica de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP)

A aplicação das técnicas miniaturizadas tem como objetivos aprimorar, economizar, racionalizar e verificar a funcionalidade dos procedimentos em pesquisas microbiológicas e métodos de quantificação de bactérias por Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) são citados como uma alternativa mais rápida e menos trabalhosa para enumeração de salmonelas (Fravalo *et al.* 2003, Pavic *et al.* 2009).

Fravalo *et al.* (2003) propuseram uma metodologia de mNMP utilizando o meio Rappaport Vassiliadis semissólido (MRSV) para seleção de salmonelas móveis e posterior desenvolvimento em meios cromogênicos. Já Pavic *et al.* (2009) validaram uma metodologia de mNMP baseada na ISO 6579:2002 usando MRSV e demonstraram não haver diferença significativa entre o NMP tradicional (tNMP) e o mNMP.

Na técnica miniaturizada, a quantidade dos meios de cultura para determinação do Número Mais Provável (NMP) será de 1 mL ao invés de 10 mL e a inoculação de cada diluição de 0,1 mL e não 1mL, economizando em dez vezes os meios utilizados. Porém, o tamanho da amostra deverá ser a mesma estabelecida pelos órgãos oficiais, evitando resultados falsos negativos, considerando-se que a amostragem e preparo dos analitos não devem apresentar variação, tendo em vista a seletividade, especificidade e coeficiente global em procedimentos analíticos para alimentos. Ao mesmo tempo, a tabela utilizada para o cálculo no NMP será mesma empregada nas técnicas não miniaturizadas (FRANCO, 2008).

Colla *et al.* (2014), avaliaram dois métodos mNMP para a quantificação de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas. No método A, utilizaram microplacas contendo 24 poços e no método B microplacas de 96 poços, sendo em ambos empregados água peptonada, meio semissólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MSRV) e 25 gramas de peito de frango contaminado com *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Escherichia coli* (EC). No método A houve correlação entre as contagens usadas para a contaminação artificial das amostras, indicando sensibilidade para quantificação de diferentes níveis de contaminação da matriz cárnea. Santos *et al.* (2015) objetivaram determinar e quantificar *Salmonella* spp. em frangos de corte e pontos do processamento de abate com microbiologia convencional e número mais provável miniaturizado (mNMP), demonstrando positividade de 5,5% para *Salmonella* spp., independentemente do método utilizado.

#### 2.2.4 PCR em Tempo Real

Métodos de análises quantitativas de ácidos nucleicos têm sido descritos e tanto a PCR tradicional quanto a PCR em tempo real têm se mostrado importantes ferramentas para análises quantitativas de ácidos nucleicos, possibilitando a realização de experimentos que não seriam viáveis por métodos tradicionais, tais como cultivo celular, isolamento em meio de cultura e provas bioquímicas (HEID *et al.*, 1996).

O avanço das técnicas de Biologia Molecular foi um dos maiores passos das ciências biológicas no século XX e têm revolucionado os conhecimentos sobre o genoma quanto a sua estrutura, expressão e função. Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos, a maioria com finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como reprodutivas e relacionadas à resistência a doenças (FAHRENKRUG *et al.*, 2001).

A principal diferença entre o PCR convencional e PCR em tempo real é que a última realiza o monitoramento da reação a cada ciclo, permitindo a detecção direta dos produtos de PCR na fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial (WONG, 2005).

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e coleção da emissão e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação (Figura 1).



Figura 1- Plataforma de instrumentação para reação em cadeia pela polimerase em tempo real (Fabricante Qiagen ®). Fonte: Site da Qiagen ®

Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes, diferem na capacidade da amostra (96 poços padrão, processamento de poucas amostras ou tubos capilares especializados), no método da excitação (laser ou fontes de espectro largo com filtros ajustáveis), além de diferenças nos *softwares* para o processamento dos dados. Conforme a PCR progride, os componentes da reação tornam-se limitantes, até que seja atingido um platô (Figura 2) (ALVARES, 2001).

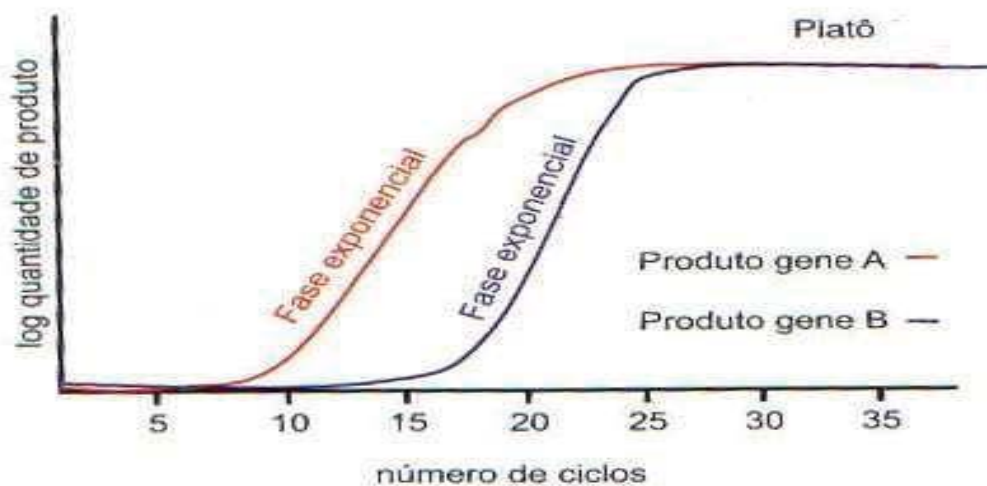


Figura 2 - Gráfico representando a amplificação de dois genes

Fonte: ALVARES, 2001

A PCR em tempo real é capaz de determinar o ciclo exato em que a amplificação é detectada. Esse ciclo é denominado *threshold cycle* ( $C_t$ ), ou ciclo limiar. O  $C_t$  é determinado

na fase exponencial da PCR e é inversamente proporcional ao número de cópias da sequência alvo. Portanto, quanto maior é a quantidade de ácido nucléico inicial, mais cedo será observado um aumento na fluorescência e menor será o  $C_t$  (BUSTIN, 2005).

#### 2.2.4.1 O princípio

A detecção em tempo real é feita monitorando-se cada amostra, ciclo a ciclo, até que uma determinada quantidade de produto seja acumulada, permitindo a detecção pelo equipamento (FUKUSHIMA, 2009). As análises quantitativas são feitas com o uso de corantes fluorescentes na PCR, como o *SYBR Green I*. Desta forma, na medida em que a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA que se ligam ao corante, resultando em aumento da fluorescência (ALVARES, 2001).

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA, realizando a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Esses compostos fluorescentes são chamados fluoróforos.

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Os mais utilizados são o *SYBR® Green* e *TaqMan®*, ambos com capacidade de hibridização gerando transferência de energia para quantificação.

#### 2.2.4.2 Método *SYBR® Green*

As análises quantitativas são feitas com o uso de corantes fluorescentes na PCR, como o *SYBR® Green*. Desta forma, na medida em que a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA que se ligam ao corante, resultando em aumento da fluorescência (ALVARES, 2001). O *SYBR® Green I* é um corante fluorescente que se liga à

cavidade menor da dupla hélice e floresce quando excitado por luz (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

A fluorescência é medida com o auxílio de um aparelho capaz de excitar as moléculas e detectar a fluorescência resultante, produzindo gráficos de amplificação. Esse método tem como principal desvantagem o fato que qualquer molécula dupla fita será detectada. Assim, produtos inespecíficos também geram sinal (ALVARES, 2001). Contudo, o SYBR<sup>®</sup> *Green* pode ser usado como ferramenta para se obter rapidamente informações sobre níveis de expressão de uma variedade de genes em múltiplas amostras. A Figura 3 mostra a fluorescência verde do SYBR<sup>®</sup> *Green* quando ligado ao DNA.

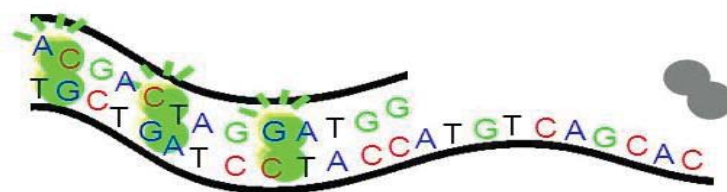


Figura 3 - Fluorescência verde do SYBR<sup>®</sup> *Green* quando ligado ao DNA

Fonte: MARTINS, 2014.

#### 2.2.4.3 Método TaqMan<sup>®</sup>

O método de *TaqMan*<sup>®</sup> utiliza uma sonda marcada com uma molécula fluorescente (fluoróforo) e outra de silenciamento intramolecular (*quencher*) além do par *primers* utilizado na PCR tradicional. A sonda é constituída de uma sequência-alvo entre os dois *primers*. O fluoróforo e o *quencher* que ficam nas extremidades da sonda só emitem sinal quando são separados por meio da clivagem da sonda pela enzima *Taq* DNA polimerase durante a reação (MARTINHAGO *et al.* 2006).

A PCR em tempo real pelo método *TaqMan*<sup>®</sup> tem uma série de vantagens sobre a PCR convencional, incluindo a possibilidade de quantificar a replicação com alta especificidade, através da inserção de uma sonda com um marcador repórter e um marcador silenciador (FUJIKAWA *et al.*, 2008). Leblanc-Maridor *et al.* (2011) utilizando TaqMan<sup>®</sup> desenvolveram um método para detecção de *Campylobacter coli* e *C. jejuni* em amostras de fezes suínas, ração e ambiente.



Nesse método, a hibridização específica é imprescindível para que seja gerada a fluorescência, então pareamentos inespecíficos não geram sinal (ALVARES, 2001). A Figura 4 mostra uma sonda *TaqMan*®.

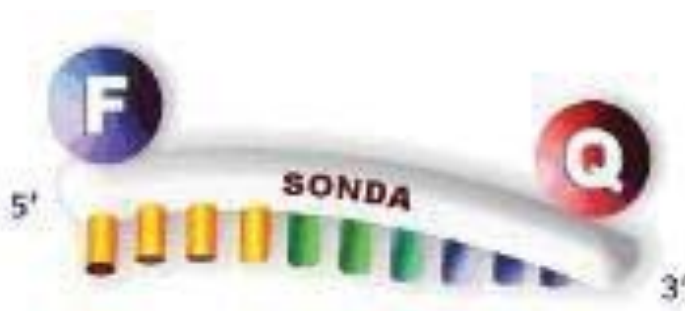


Figura 4 - Ilustração de uma sonda TaqMan®

Fonte: CAMARGO et. al. (2013)

Já para quantificação de DNA pela PCR em tempo real existem duas metodologias: quantificação absoluta e quantificação relativa. Na primeira, a construção de uma curva padrão (*standard curve*) é utilizada para determinar o número de cópias de DNA. Para a construção desta curva utiliza-se diluições seriadas de uma amostra de DNA com concentração conhecida. Já na quantificação relativa, ou método comparativo, é feita a curva padrão para o gene alvo e para o gene referência, permitindo posteriormente a comparação da expressão de ambos através dos valores do *Ct* (ciclo limiar ou *Cycle Threshold*) de cada amostra (PFAFFL, 2001). Esta é a metodologia mais utilizada quando existem muitos genes a serem testados em várias amostras (LEUTENEGGER *et al.*, 2000).

#### 2.2.4.4 Aplicações na pesquisa em alimentos

O diagnóstico rápido de organismos patogênicos que causam doenças transmitidas por alimentos é necessário para garantir alimentos seguros. Os métodos tradicionais de cultura, isolamento e identificação de patógenos alimentares em surtos são demorados e trabalhosos. Assim, esforços têm sido feitos para reduzir o tempo de identificação desses patógenos (FUKUSHIMA *et al.*, 2007)

O PCR em tempo real é frequentemente utilizado para a detecção e quantificação de patógenos em alimentos (RUDI *et al.*, 2005). Blevé *et al.* (2003) utilizaram o PCR em tempo real para quantificar bolores e leveduras em iogurtes, leites e sucos contaminados natural e artificialmente. Daum *et al.* (2002) isolaram *Salmonella* tanto por métodos de cultivo tradicionais quanto PCR em tempo real em uma amostra de frango associada a um surto de gastroenterite no Texas.

Fricke *et al.* (2007) investigaram dois surtos de doenças transmitidas por alimentos na Alemanha e constaram por PCR em tempo real que o agente etiológico era *Bacillus cereus*. Maciel *et al.* (2011) compararam métodos tradicionais de cultura e isolamento e PCR em tempo real, constatando que 45 de 243 amostras provenientes de animais assintomáticos apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp. na PCR e resultados negativos no método microbiológico. Entretanto, faz-se necessário esclarecer que células inviáveis podem ser detectadas pelo PCR em tempo real, o que não ocorre em métodos tradicionais de cultura e isolamento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO E SELEÇÃO DE AMOSTRAS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (HV/UPF), Microbiologia de Alimentos do Centro de Pesquisa em Alimentos (CEPA/UPF) e Imunologia e Microbiologia Avançada da Universidade de Passo Fundo. As amostras selecionadas para a execução deste trabalho foram provenientes de projetos que visaram a identificação de *Salmonella* spp. por microbiologia convencional (MC) e/ou quantificação por número mais provável miniaturizado (mNMP) em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte (Santos et. al. 2015; Mion et al. 2016). Os pontos amostrados e a forma de coleta estão discriminados no Quadro 1.

Quadro 1 - Pontos e forma de coleta de amostras em diferentes etapas da tecnologia de abate de frangos de corte.

Ponto Amostrado	Forma de coleta
- <i>Swabs</i> cloacais.	Foram amostradas 300 aves em cada coleta, sendo utilizado um <i>swab</i> para cada duas aves, compondo um <i>pool</i> de 50 <i>swabs</i> que foram acondicionados em frascos com 50 mL de água peptonada tamponada (APT 1,0%, Oxoid®).
- Gaiolas de transporte antes e após a higienização.	A amostragem das gaiolas foi realizada com esponjas bacteriológicas com neutralizante ( <i>Sponge Stick Neutraling Buffer</i> 3M), acondicionadas em saquetas fornecidas pelo fabricante, e no laboratório adicionou-se 50mL de APT 1 %.
- Carcaças: antes e após escaldagem; após depenagem, lavagem, evisceração, <i>chiller</i> , lavagem final, resfriadas a	As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e identificadas com lacres oficiais. No laboratório cada amostra foi rinsada com 400 mL de APT 1% e homogeneizados manualmente por 30

4°C, congeladas a -12°C por 24 horas, 30 e 60 dias.	segundos.
- Água: da escaldagem, de abastecimento do pré-chiller, de pré-chiller e chiller.	Coletados 100 mL de água, acondicionados em frascos estéreis contendo tiosulfato de sódio e transportadas sob refrigeração até o laboratório.

As coletas foram realizadas em frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2014. O critério de seleção das amostras para execução da metodologia de PCR em tempo real foi positividade para *Salmonella* spp. no abatedouro amostrado, independentemente da técnica utilizada (MC ou mNMP), o que configurava o lote como positivo para a bactéria.

Foram selecionados cinco lotes de quatro abatedouros diferentes, totalizando 139 amostras, armazenadas em Água Peptonada Tamponada 1% e aliqüotadas logo após o processamento, sem incubação, sendo congeladas a -18°C até os procedimentos de extração de DNA e PCR em tempo real.

### 3.2 AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

#### 3.2.1 Curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real

Previamente a realização da amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real foi construída uma curva padrão (*standard curve*) para determinação do número de cópias de DNA para quantificação absoluta das amostras selecionadas para o experimento. Para a construção desta curva utilizou-se diluições seriadas de uma amostra de DNA com concentrações conhecidas de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Colônias retiradas do Agar PCA foram inoculadas em caldo BHI e incubadas à 37°C *overnight*, sob agitação de 200 rpm. Após, realizou-se a leitura da Densidade Ótica (D.O.) em nano espectrofotômetro (Implen®) (DO<sub>600nm</sub> 0.5) e o conteúdo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em PBS. A DO<sub>600nm</sub> foi ajustada para 1.0 e foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup> utilizando-se 100µL de inóculo em 900µL

de PBS. Realizou-se o plaqueamento das diluições em ágar PCA e incubação a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas destas diluições para confirmação das células viáveis de *Salmonella* Typhimurium.

### 3.2.2 Extração de DNA genômico para determinação da curva padrão

Para extração de DNA utilizou-se o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®) conforme orientações do fabricante, sendo 1 mL da cultura *overnight* com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  1.0 transferida para micro tubo e centrifugada a 11.700 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 600  $\mu\text{L}$  de *Nuclei Lysis Solution*. Em seguida, incubou-se a  $80^\circ\text{C}$  por 5 minutos para lise das células e adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  de *RNase Solution* quando o micro tubo atingiu temperatura ambiente. Incubou-se a amostra a  $37^\circ\text{C}$  por 15 minutos e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de *Protein Precipitation Solution* ao lisado de células. Após homogeneização em vórtex incubou-se em gelo por 5 minutos e centrifugou-se a amostra a 11.700 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo micro tubo com 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol e homogeneizou-se por inversão até a formação de uma massa visível de DNA em forma de fitas. Centrifugou-se a 11.700 rpm por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de etanol a 70%. A amostra foi novamente centrifugada a 11.700 rpm por 2 minutos e o etanol aspirado, a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, permitindo a secagem do *pellet*. Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de *H<sub>2</sub>O free RNase and DNase* e estocou-se o DNA extraído entre 2 e  $8^\circ\text{C}$  negativos.

### 3.2.3 Amplificação de *Salmonella* Typhimurium para determinação da curva padrão

A partir do DNA com DO 1.0 retirou-se 3 $\mu\text{L}$  e inseriu-se em micro tubos contendo 27  $\mu\text{L}$  de *RNase-free water*, realizando-se diluições seriadas de  $10^{-1}$  até  $10^{-9}$ . Após, 1  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi transferido para 10 micro tubos, em duplicata, adicionados de 9  $\mu\text{L}$  de água para PCR e 10  $\mu\text{L}$  do *mix* de reação (*Reconstituted mericon Assay*). O controle negativo foi preparado em micro tubo contendo 10  $\mu\text{L}$  do *Reconstituted mericon* e 10  $\mu\text{L}$  de água para PCR e o controle positivo por 10  $\mu\text{L}$  do *Reconstituted mericon Assay* e *Dissolved Positive Control DNA*. Todos os micros tubos foram acondicionados no Rotor GeneQ®, da Qiagen, e

realizada a programação do equipamento para a reação de PCR em tempo real com 40 ciclos (Quadro 2).

Quadro 2 - Programação do equipamento *Rotor- Gene Q* para a reação de PCR em tempo real.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Ativação da PCR	5 minutos	95°C
<b>3 etapas de ciclagem</b>		
Desnaturação	15 segundos	95°C
Anelamento	15 segundos	60°C
Extensão	10 segundos	72°C

Fonte: Manual do Fabricante. Qiagen ®

#### 3.2.4 Extração de DNA das amostras avaliadas

Para a extração do DNA utilizou-se *kit* comercial denominado *mericon DNA Bacteria Kit* (Qiagen®), que é baseado em uma lise mecânica, utilizando esferas, que cria condições necessárias para a extração; e uma lise térmica, por fervura, que proporciona a ruptura e extração do DNA de diferentes tipos de bactérias. Alíquotas de 1 mL das amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 200 µL de solução de lise denominada *Fast Lysis Buffer* ao *pellet* bacteriano, centrifugando-se a 13000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi lavado por cinco vezes e os *ependorfs* colocados em bloco térmico a 100°C por 10 minutos, com agitação de 800 rpm. Após, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos e novamente centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram armazenadas em *freezer* a -80°C para a realização da PCR em tempo real.

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

Para a amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real utilizou-se o *mericon Salmonella spp. kit* (Qiagen ®), designado para a detecção da bactéria em alimentos. Este *kit* é composto pelo *Multiplex PCR Master Mix*, que contém a enzima DNA polimerase

*HotStarTaq Plus*, solução tampão de PCR, *mix* de dNTP, *primers* e sondas específicas para amplificação da sequência alvo, além do controle positivo de DNA.

A reação de amplificação foi composta por 20  $\mu\text{L}$ , sendo 10  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA a ser amplificada e 10 $\mu\text{L}$  do *mix* de reação. As condições de amplificação foram: aquecimento por 5 minutos a 95°C para ativação da DNA polimerase *HotStarTaq Plus*, 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 60°C e extensão por 10 segundos a 72°C em *Rotor-gene Q*.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL

Os resultados da curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 estão expressos na Figura 5.

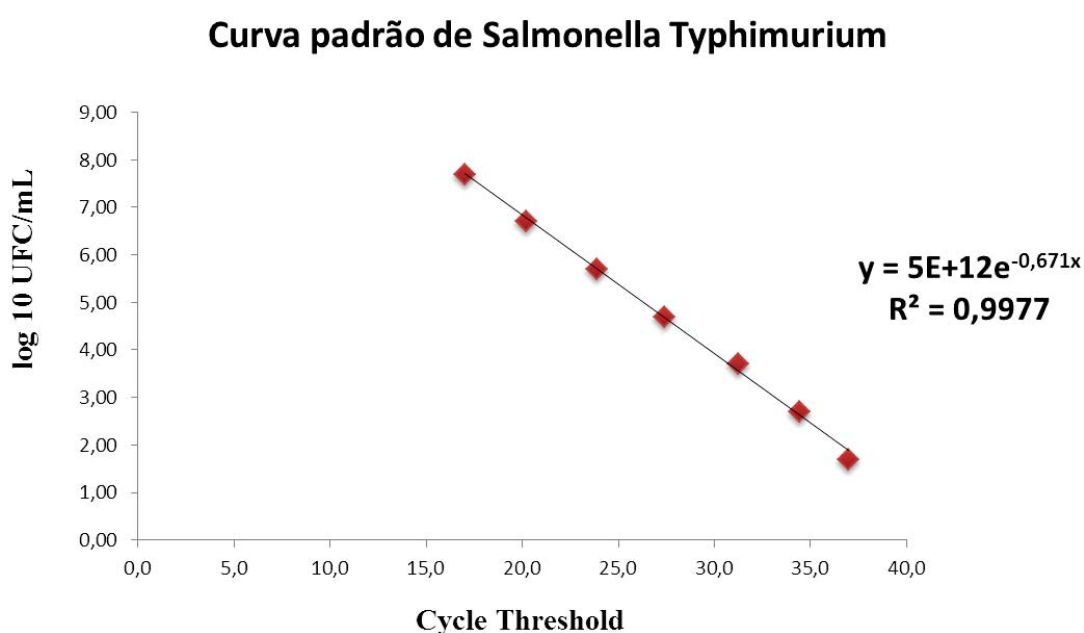


Figura 5 - Curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Na Figura 5 está demonstrada a relação entre as contagens de colônias ( $\log_{10}\text{UFC/mL}$ ) e os pontos que detectam os ciclos nas quais as reações atingem o limiar da fase exponencial (*Cycle threshold*, *Ct*). Essa relação foi posteriormente utilizada para identificar a amplificação de DNA de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas, que conforme os resultados da curva padrão deveriam mostrar um *Ct* entre 17 e 37. No Quadro 3 estão demonstrados os valores de *Ct* relativos as contagens em UFC/mL e conversão para  $\log_{10}$  UFC/mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  de *Salmonella* Typhimurium utilizadas para construção da curva padrão. Deste modo, uma amostra naturalmente contaminada com estes valores de referência teria amplificação de DNA de *Salmonella* spp. e seria considerada positiva.

Quadro 3 - Valores de Ct relativos as contagens em UFC/mL e conversão para log<sub>10</sub>UFC/mL das diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> de *Salmonella* Typhimurium utilizadas para construção da curva padrão de PCR em tempo real.

Diluições	Ct	UFC/mL	Log log <sub>10</sub> /UFC/mL
10 <sup>-1</sup>	17,0	50000000	7,70
10 <sup>-2</sup>	20,2	5000000	6,70
10 <sup>-3</sup>	23,9	500000	5,70
10 <sup>-4</sup>	27,4	50000	4,70
10 <sup>-5</sup>	31,3	5000	3,70
10 <sup>-6</sup>	34,5	500	2,70
10 <sup>-7</sup>	37,0	50	1,70

#### 4.2 AMPLIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

Foram previamente amostrados cinco lotes com coletas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frangos de corte, totalizando 139 amostras selecionadas por conveniência. Destas 139 amostras, 68 (49%) apresentaram positividade para *Salmonella* spp. pelo método de PCR em tempo real, 15 (10,8%) por Microbiologia Convencional (MC) e 12 (8,6%) por mNMP (Quadro 4).

Quadro 4 - Relação de amostras positivas para *Salmonella* spp. em cinco lotes avaliados por Microbiologia Convencional (MC), Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) e PCR em tempo real.

Coleta	Amostras avaliadas por coleta	Positividade para <i>Salmonella</i> spp.		
		MC	mNMP	PCR em tempo real
<b>1 (C15)</b>	12	0 (0%)	1 (8,3%)	8 (67%)
<b>2 (C20)</b>	15	1 (6,7%)	0 (0%)	10 (67%)
<b>3 (C19)</b>	40	2 (5%)	1 (2,5%)	13 (32,5%)
<b>4 (LA)</b>	36	6 (16,7%)	10 (27,8%)	29 (80,5%)
<b>5 (LF)</b>	36	6 (16,7%)	0 (0%)	8 (22%)
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>15 (10,8%)</b>	<b>12 (8,6%)</b>	<b>68 (49%)</b>

O Quadro 4 mostra a sensibilidade do método de PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* spp. em amostras isoladas de abatedouros avícolas, com destaque para o lote 4, com 80,5% (29/36) de positividade para a bactéria.

No lote 1 foram avaliadas 12 amostras, das quais nenhuma foi positiva por MC e uma foi positiva por mNMP. Já por PCR em tempo real foram identificadas 8 (67%) amostras positivas para *Salmonella* spp., demonstrando a sensibilidade deste método. O mesmo ocorreu no lote 5, onde avaliou-se 36 amostras, das quais 6 (16,7%) foram positivas por MC, nenhuma por mNMP e 8 (22%) por PCR em tempo real.

Os resultados do lote 4 (N = 36) apontaram 6 (16,7%) amostras positivas por MC, 10 (27,8%) por mNMP e 29 (80,5%) por PCR em tempo real. É importante destacar que dentre estas 29 amostras positivas, 13 foram previamente consideradas negativas pelos métodos de Microbiologia Convencional e mNMP, mostrando a importância de um método molecular de identificação aliado à microbiologia convencional. Neste sentido, O'Regan et al. (2008) testaram um ensaio de PCR *multiplex* em tempo real para a detecção de múltiplos sorovares de *Salmonella* em cortes de frango onde a PCR foi tão sensível quanto a microbiologia convencional para detecção de *Salmonella*, porém de forma mais rápida e simples, habilitando-se para identificação de *Salmonella* em laboratórios de análise de alimentos.

Com relação aos métodos microbiológicos, é importante esclarecer que células inviáveis podem ser detectadas por PCR (HERMAN, 1997; MCKILLIP *et al.*, 1999; NOGVA *et al.*, 2003 *apud* RUDI *et al.*, 2007), o que não ocorre em métodos tradicionais de cultura e isolamento, que requerem a viabilidade celular e consequente multiplicação em meios de cultura.

Do mesmo modo, Pochop et al. (2012), realizaram uma contaminação artificial de produtos cárneos e verificaram a contaminação por *Salmonella* spp. utilizando o PCR em tempo real e observaram genes de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, concluindo que a PCR em tempo real seria útil, rápida, reprodutível, simples e sensível para detectar ácidos nucleicos. Igualmente, Richter et al (2014) testaram 58 amostras isoladas de aves com a provável ocorrência de *Salmonella* spp. e, com a metodologia de PCR em tempo real, identificaram 79,3% de positividade (46/58).

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real também mostrou ser um método rápido e sensível na detecção de agentes patogênicos para Gonçalves (2014), que avaliou o limite de detecção da técnica para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, demonstrando a boa sensibilidade da técnica de PCR, com 2 e 5 UFC/g, respectivamente.

Ao se avaliar os resultados do lote 2 (N = 15) verificou-se que uma amostra foi positiva por MC e nenhuma por mNMP, enquanto na avaliação por PCR em tempo real 10 amostras (67%) foram positivas para *Salmonella* spp. Porém, um dos pontos amostrados (*swab* de gaiolas de transporte após lavagem) foi positivo por MC mas apresentou resultado negativo na metodologia de PCR em tempo real.

Embora haja superioridade no número total de amostras positivas para *Salmonella* pela técnica de PCR em tempo real também ocorreram divergências no lote 3, quando foram analisadas 40 amostras, das quais duas (5%) foram positivas por MC, uma por mNMP (2,5%) e 13 (32,5%) por PCR em tempo real. Entretanto, dois pontos positivos por métodos microbiológicos (carcaças após lavagem, positivo por MC; carcaças após o resfriamento, positivo por mNMP) foram negativos na análise por PCR em tempo real. Nestes casos, as discrepâncias de resultados entre os métodos podem ter ocorrido devido ao limite de detecção determinado pela quantidade de material que pode ser amplificado em uma única reação ou pelos volumes diminutos utilizados na PCR em tempo real.

A presença de *Salmonella* spp. em carne de aves e materiais avícolas têm sido relatada em várias pesquisas. Segundo Carvalho et al (2005), 13,3% de 45 amostras analisadas não atenderam ao padrão de ausência de *Salmonella* em 25g de produto analisado, conforme estabelecido pela legislação (Brasil 2001), estando, portanto, impróprias para o consumo. Silva et al. (2004) relatam a presença do microrganismo em 13 de 68 amostras analisadas e Almeida Filho et al. (2003) constatou 18 amostras contaminadas por *Salmonella* spp. dentre 40 analisadas.

Medeiros (2013), com o intuito de investigar e detectar *Salmonella* spp. em abatedouros avícolas avaliou swabs de vários pontos da tecnologia de abate de frangos de corte através do método de PCR convencional e de PCR em tempo real. Através do estudo constatou-se que a técnica de PCR em tempo real foi capaz de identificar maior número de amostras positivas, 22 (7,3%) em comparação à PCR convencional que detectou cinco (1,6%), o que possibilitou concluir que a PCR em tempo real pode agilizar o diagnóstico laboratorial, sendo feito pré-enriquecimento seletivo com aplicação do meio de cultura de forma imediata e que *Salmonella* spp. está presente em alimentos de origem avícola e em instalações e equipamentos.

Esses dados demonstram a preocupação do setor quanto aos critérios higiênicos sanitários adotados na cadeia produtiva avícola, principalmente pela relevância desse patógeno para saúde pública. Assim, para o melhor rastreamento da bactéria e redução de

resultados falso negativos pode ser indicada a combinação de métodos microbiológicos convencionais e métodos moleculares para identificação de *Salmonella* spp.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

A partir dos resultados de amplificação de DNA das amostras avaliadas, o que configurava positividade para *Salmonella* spp., foram aplicadas equações para quantificar esta contaminação que tinha por objetivo avaliar a variação da contaminação pela bactéria na tecnologia de abate de frangos de corte.

Os resultados destas quantificações permitem inferir que a contaminação por *Salmonella* spp. nos abatedouros é variável, mas que geralmente as aves chegam ao abatedouro com um nível de contaminação que é diminuído ao longo da tecnologia de abate, ressaltando a importância da biossegurança nas granjas e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação nos abatedouros.

Os Gráficos 1 a 5 demonstram a quantificação da contaminação por *Salmonella* spp. identificada por PCR em tempo real na tecnologia de abate de cinco lotes de frangos de corte.

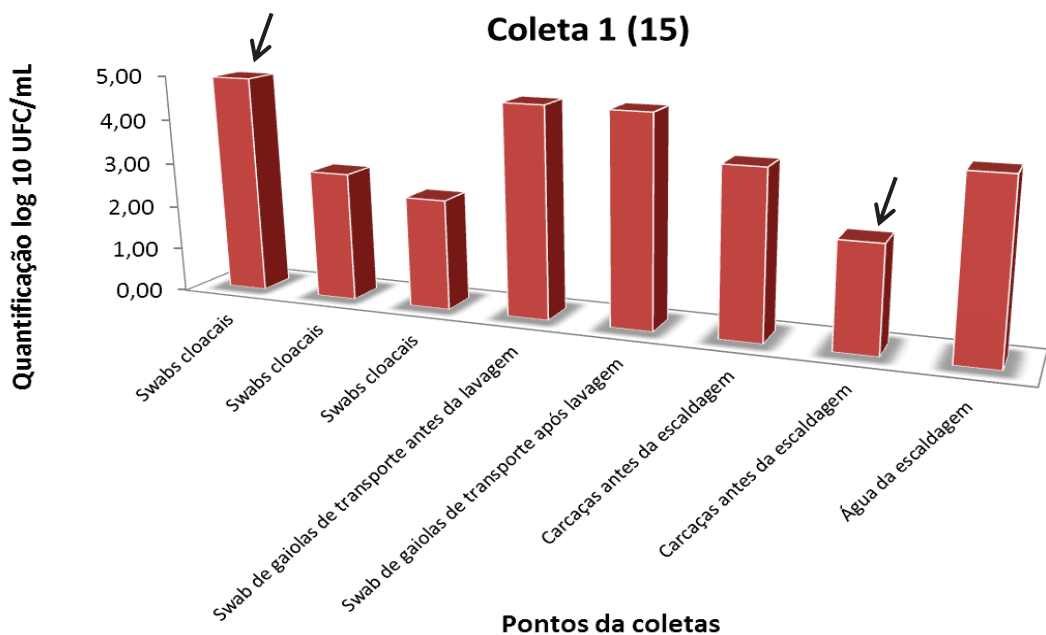


Gráfico 1 - Relação dos pontos de coleta e suas contaminações provenientes da coleta 1 (15).

No lote 1 (Coleta 15), o ponto com maior contaminação identificado por PCR em tempo real foi *swab* de cloaca (4,93 log<sub>10</sub> UFC/mL), demonstrando que em geral a contaminação é maior no início do abate, tendo em vista que *Salmonella* spp. está presente no trato intestinal dos frangos. Já a menor contaminação foi evidenciada em carcaça antes da escaldagem (2,36 log<sub>10</sub> UFC/mL), mostrando que a quantidade da bactéria diminuiu em relação ao *swab* de cloaca, mas que ainda se fez presente antes da etapa da escaldagem.

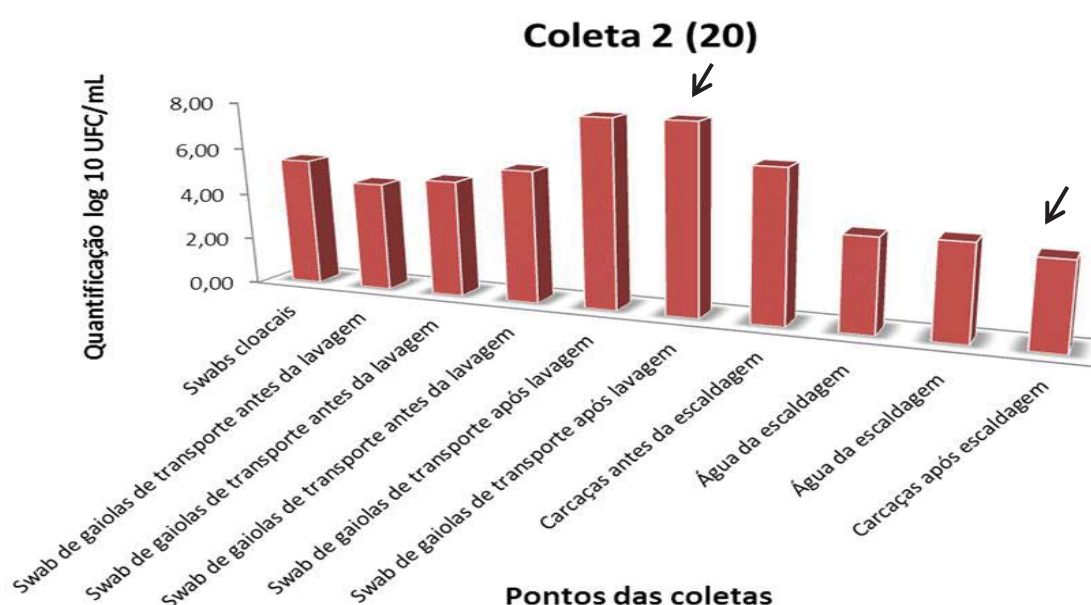


Gráfico 2 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log<sub>10</sub> UFC/mL) no lote 2 (Coleta 20).

Os resultados da quantificação do lote 2 (Coleta 20) mostram que o ponto com maior contaminação foi gaiola de transporte após lavagem (7,99 log<sub>10</sub> UFC/mL). Este foi também o ponto com maior contaminação por *Salmonella* spp. identificado nesta pesquisa. Este resultado gera bastante preocupação, tendo em vista que as gaiolas podem não estar sendo higienizadas e sanitizadas de forma adequada e assim retornarem para as granjas contaminadas por *Salmonella* spp., agravando o problema e dificultando o controle deste.

Por outro lado, o ponto com menor contaminação neste lote foi carcaça após escaldagem (3,63 log<sub>10</sub> UFC/mL), mostrando que este ponto da tecnologia de abate, embora

não tenha como objetivo redução bacteriana e sim facilitar a retirada das penas, auxilia indiretamente no controle do patógeno.

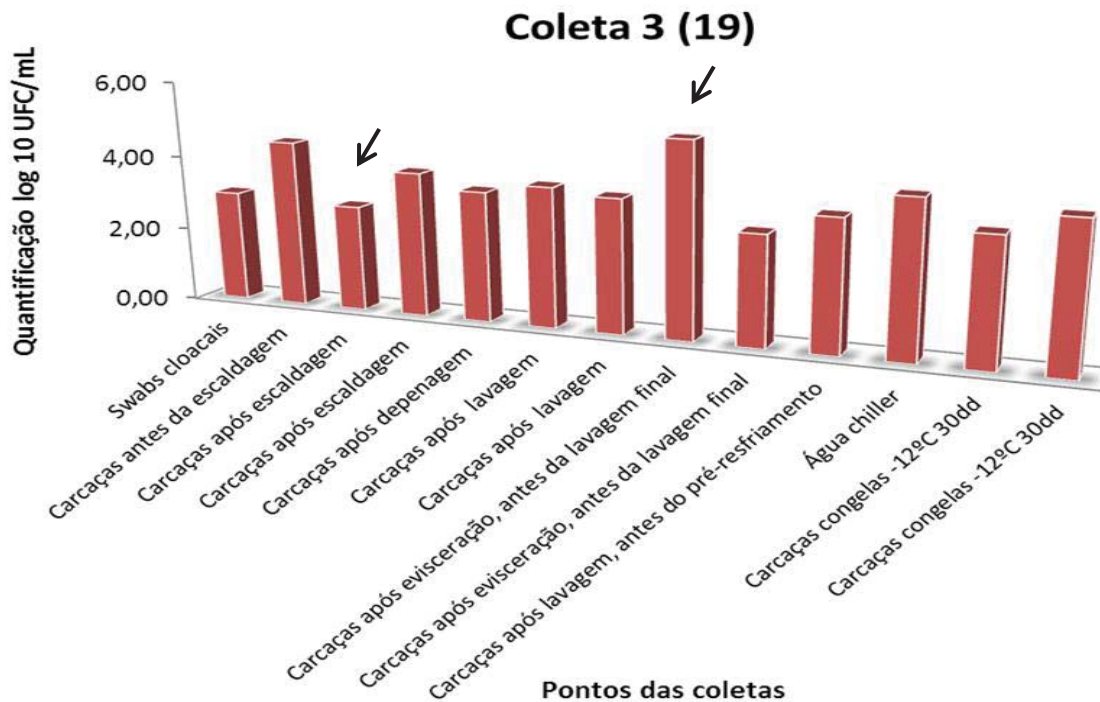


Gráfico 3 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 3 (Coleta 19).

Neste lote, a maior contaminação foi encontrada na carcaça eviscerada antes da lavagem final (5,14 log 10 UFC/mL), demonstrando a necessidade de avaliação deste ponto, uma vez que a próxima etapa é a lavagem e na sequência o resfriamento da carcaça em *chiller*, o que poderia levar a contaminação cruzada de outras carcaças e conseqüentemente do produto final.

Já na carcaça após a escaldagem foi verificada a menor contaminação deste lote (2,83 log 10 UFC/mL). Segundo Obdam (2008), a temperatura da água de escaldagem varia entre 50°C e 70°C e tem por objetivo a abertura dos poros para facilitar a depenagem que ocorre em seguida, mas também auxiliaria a reduzir a carga microbiana. No presente trabalho, isto pôde ser verificado pela comparação entre a contaminação encontrada na carcaça antes da

escaldagem (4,46 log 10 UFC/mL) e a carga microbiana após a escaldagem (2,83 log 10 UFC/mL).

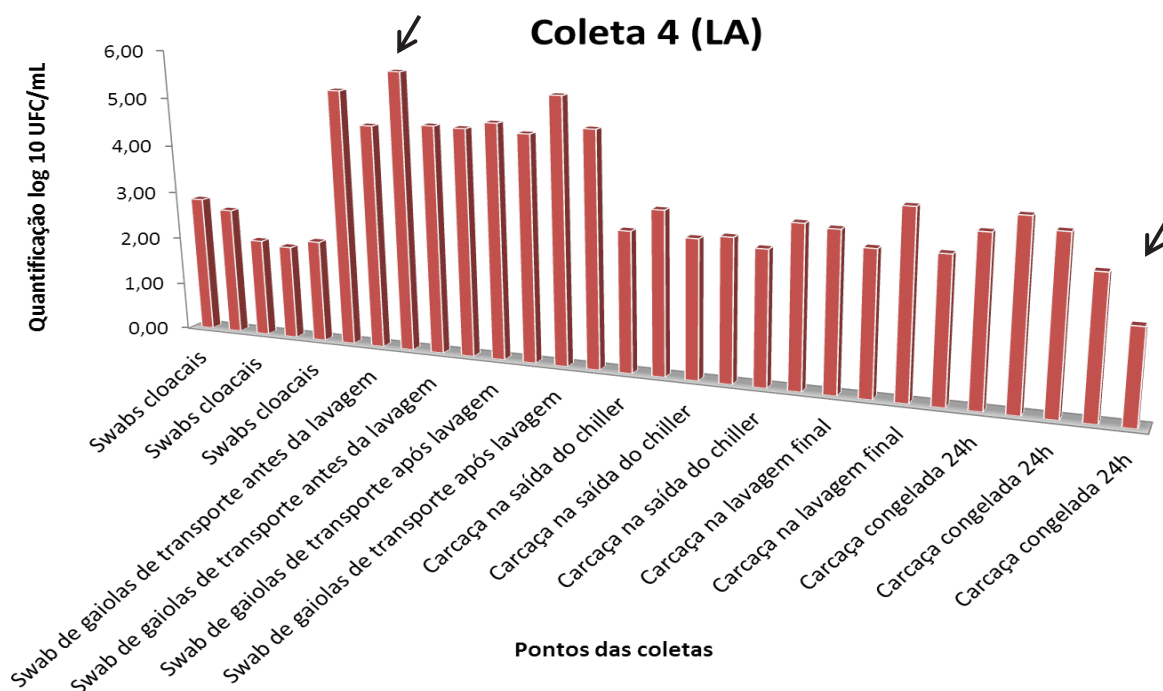


Gráfico 4 - Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 4 (Coleta LA).

O lote 4 (Coleta LA) apresentou o maior número de pontos contaminados, com 29 de 36 amostras (80,5%) apresentando contaminação por *Salmonella* spp.

Seguindo a hipótese de que a contaminação por *Salmonella* spp. é geralmente maior no início da tecnologia de abate, observou-se 5,77 log 10 UFC/mL em *swab* de gaiola de transporte antes da higienização e 1,96 log 10 UFC/mL em *swabs* de cloaca. Destaca-se novamente a necessidade da adequada higienização das gaiolas de transporte para evitar a recontaminação dos lotes a partir de gaiolas contaminadas. Também, deve-se considerar que uma contaminação inicial alta pode ser reduzida mas não completamente eliminada dos



produtos finais, como ficou demonstrado na contaminação de carcaças congeladas a 12°C por 24 horas.

Concordando com estes resultados, Dias et. al. (2015) realizaram o rastreamento molecular de *Salmonella* spp. no processamento de frangos de corte para traçar as principais rotas de contaminação pelo patógeno. Foram obtidas 277 amostras em etapas distintas do abate como depenagem, evisceração, pré-resfriamento e cortes (coxa, asa e peito) além de gaiolas de transporte, esteiras de corte, mãos de funcionários e facas. Os resultados demonstraram a maior contaminação nas etapas iniciais de abate e um maior controle na etapa de pré- resfriamento.

Neste sentido, ao analisar os resultados do lote 4, constatou-se a contaminação por *Salmonella* spp. em carcaça congelada a -12°C por 24 horas e, mesmo com a menor quantificação de contaminação do lote (1,93 log 10 UFC/mL). Este resultados é preocupante por tratar-se de um produto final, disponível para o consumidor, e que deveria apresentar ausência de contaminação.

Também, verificou-se que a contaminação inicial por *Salmonella* spp. no lote 4 foi reduzida mas não eliminada, indicando a necessidade de revisão e adequação dos programas de auto controle dos abatedouros para atender aos níveis de segurança regulamentados em legislações específicas. Por outro lado, a quantificação da contaminação permite focar em pontos específicos que podem ser aprimorados, e assim direcionar os procedimentos que objetivam a redução desta contaminação, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Confirmando esta ideia, Costa et al. (2014) formularam um plano de controle sanitário para produtos avícolas baseados em resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. e nas observações das atividades desenvolvidas, sugerindo etapas críticas de controle na aplicação do sistema APPCC. Foi realizada a quantificação de *Salmonella* spp. por Número Mais Provável (NMP) em seis etapas do processo, durante seis coletas, e a determinação dos Pontos Críticos de Controle (PCC) desta planta de abate incluiu as etapas de escaldagem/depenagem, de pré-resfriamento (pré- *chiller* e *chiller*), bem como congelamento das carcaças.

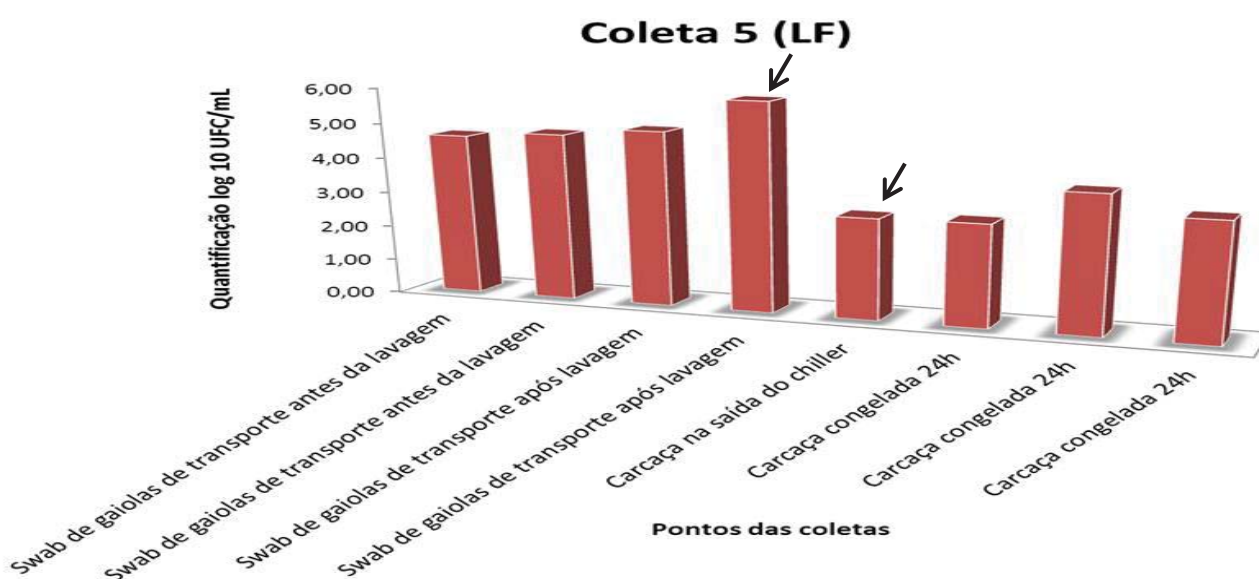


Gráfico 5- Relação dos pontos de coleta e quantificação da contaminação (log 10 UFC/mL) no lote 5 (Coleta LF).

O lote 5 (Coleta LF) apresentou o menor número de amostras contaminadas, com 8 (22%) amostras positivas dentre 36 avaliadas. Entretanto, o ponto com maior contaminação foi novamente *swab* de gaiola de transporte após a lavagem (5,91 log 10 UFC/mL), o que confirma a necessidade de um APPCC mais rigoroso e higienização e sanitização no PPHO adequados nas gaiolas de transporte afim de evitar a propagação de *Salmonella* spp. e consequente contaminação cruzada.

Já a menor contaminação do lote foi verificada em carcaça após o resfriamento em *chiller* (2,87 log 10 UFC/mL), demonstrando a eficácia desta etapa para redução da contaminação bacteriana mas não a eliminação de uma contaminação prévia. Segundo Olivo (2006), antes do resfriamento, as carcaças têm temperatura média de 40°C, que deve ser

reduzida a 4°C nos tanques de imersão, usando-se o centro do músculo peitoral como ponto de controle dessa temperatura. A legislação brasileira estabelece o uso de pelo menos dois tanques de resfriamento, denominados *chillers*, com temperatura máxima de água a 16°C no primeiro *chiller* e inferior a 4°C no segundo *chiller* (BRASIL, 1998).

Entretanto, existem controvérsias em relação à ação do resfriamento por imersão sobre os microrganismos. Autores mencionam que como nesse sistema as carcaças estão submersas em água abundante, além do resfriamento, ocorreria a lavagem da superfície do produto, reduzindo a carga microbiana (SCHIMDHOFER, 1994, YOUNG; SMITH, 2004; GRILL et al., 2006; BARBUT, 2002; ALLEN et al., 2000). Porém, outros autores citam que neste método existe o risco da contaminação cruzada pela água de imersão, o que tornaria necessária sua renovação constante (POTOSLKI; GRUDA, 1986; BERGMANN; RITTER, 2003).

Hargins et al. (2004) também mencionam a importância do controle das etapas anteriores para reduzir a contaminação superficial e o desenvolvimento de microrganismos potencialmente capazes de contaminar a água de resfriamento.

Da mesma forma que no lote 4 (LA), as carcaças congeladas a -12°C por 24 horas apresentaram contaminação por *Salmonella* spp, demonstrando que o resfriamento ou mesmo o congelamento não inviabiliza a presença de bactérias como as do gênero *Salmonella*.

O controle de *Salmonella* em produtos destinados ao consumo humano passa por medidas como a ampliação de métodos de diagnóstico e identificação e quantificação da contaminação, sem jamais prescindir de medidas básicas de higiene e sanitização. Assim, estudos com métodos para detectar e quantificar *Salmonella* spp. são necessários para a adoção de medidas eficazes de BPF, PPHO e APPC, visando minimizar a contaminação por *Salmonella* spp. em produtos avícolas.



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados permitem inferir que a contaminação por *Salmonella* spp. nos abatedouros é variável, mas que geralmente as aves chegam ao abatedouro com um nível de contaminação que é diminuído ao longo da tecnologia de abate, ressaltando a importância da biossegurança nas granjas e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação nos abatedouros. As indústrias são responsáveis por assegurar a qualidade microbiológica dos produtos de origem animal, e para tanto precisam ter à sua disposição métodos eficazes, sendo a PCR em tempo real um bom recurso diagnóstico para análises relacionada ao ambiente de abate e produtos finais prontos para consumo humano.



## REFERÊNCIAS

- ALVARES, L. E. Aplicação da RT-PCR nos estudos da expressão gênica. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada a produção animal*. Brasília: **Embrapa**, p. 135-150, 2001.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. **Applied Biosystems**. 2008. Disponível em: <[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042380.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- BAGGENSEN D.L., BAGGER J., MOGELMOSE V., NIELSEN B., SVENSMARK B. & OLSEN J.E. Quantification of DT104 in slurry from infected pigs. **Report on the 6<sup>th</sup> Workshop organized by CRL – Salmonella**. June 11-12, Report 284500019/2001. RIVM, Bilthoven, Belgium. p.30-32, 2001.
- BOROWSKY, L.M. **Comparação de dois métodos de quantificação de Salmonella sp. em embutidos suínos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre, 24 p, 2005.
- BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Número mais provável de Salmonella isoladas de carcaças de frango resfriadas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p.2338-2342, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 08, 23/01/1995, que institui o Método Analítico de Carcaça de Aves e Pesquisa de Salmonella. Brasília: **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**, 1995. A – Publicada no Diário Oficial da União.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 78, de 3 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Galinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 nov., Seção 1, Pág. 3, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2014. 35 p.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Michigan retail store recalls ground beef products due to possible Salmonella Contamination: **FSIS-RC-009-2013**. 2013.
- CHEN, M.H.; CHIOU, C.S.; CHIANG, Y.C.; TSAI, S.W.; TSEN, H.Y. Comparison of the pulsed field gel electrophoresis patterns and virulence profiles of the multidrug resistant strains of Salmonella enterica serovar Schwarzengrund isolated from chicken meat and humans in Taiwan. **Food Research International**, v.45, n.2, p.978-983, 2012.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC) 2007. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management**. (MRM) CAC/GL, 63-2007.

COLLA, F.L. et al. Miniaturized Most Probable Number for the Enumeration of *Salmonella* sp in Artificially Contaminated Chicken Meat. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.16, n.1, p. 45-48, 2014.

COLLA, F.L.; MION, L; PARIZOTTO, L; et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas em diferentes pontos do abate de suínos. **Anais da XXI Mostra de Iniciação Científica-UPF**, Passo Fundo: UPF, 2011.

DIAS, M. R. **Rastreamento molecular de *Salmonella* spp. e contaminação microbiológica na linha de abate e processamento de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG, 2015.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.3, p.569-573, 2009.

ESCARTIN, E. F. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from Mexican butcher shops. **Food Microbiology**, v.12, p.435-439, 1995.

FAHRENKRUG, S.C, ROHRER, G. A., FREKING, B.A., SMITH, T.P., OSOEGAWA, K., SHU, C.L., CATANESE, J.J. A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. **Mammalian Genome** v.12, p. 472-474, 2001.

FLORES A.M.P.C. & Melo C.B. [Main bacteria that cause foodborne diseases.] Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, ICC37(1):65-72, 2015.

FORSYTHE S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, Brasil: Artmed, p.410; 2002.

FRANCO, R. M. Importância da aplicação dos métodos miniaturizados nos diagnósticos em microbiologia de alimentos. **Revista Microbiologista**. 2008.

FRAVALO, P.; HASCOET, Y.; LE FELLIC, M.; QUEGUMER, S.; PETTON, J.; SALVAT, G. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella* enteric contamination: the mini-MSRV MPN technique. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. 11(2): 81– 88, 2003.

FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & saúde coletiva**. Rio de Janeiro. v. 11, n. 7, p. 1073-1083, 2006.

FUKUSHIMA, H.; KATSUBE, K.; TSUNOMORI, Y.; KISHI, R.; ATSUTA, J.; AKIBA, Y.; Comprehensive and Rapid Real-Time PCR Analysis of 21 Foodborne Outbreaks. **International Journal of Microbiology**. V. 2009, 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2009/917623/>>. Acesso em: 14 jan. 2016.



GALDINO, V.M.C.A.; MELO, R.T.; OLIVEIRA, R.P.; MENDONÇA, E.P.; NALEVAIKO, P.C.; ROSSI, D.A. Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. **Bioscience Journal**, v.29, n.4, p.932-939, 2013.

GIORDANO, L. Tecnologia per la produzione industrial e dicotolette dipollo. **Eurocarni**, n.3, 2004.

GRIMONT P, WEIL F. ANTIGENIC. Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: World Health Organization. 9th edn Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur Paris**. Paris, p.6-7, 2007.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. Cold Spring Harbor Laboratory Press. **Genome research**. V. 6, 1996.

IZAT, A. L.; KOPEK, J. M.; MCGINNIS, J. D. Incidence, number and serotypes of *Salmonella* on frozen broiler chickens retail. **Poultry Science**, v. 70, p.1438-1440, 1991.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, V.58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 206p, 2005.

JONG H.K., PARRY C.M., POLL T.V.D., WIERSINGA W.J. Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**., 8(10):1-9, 2010.

LÁZARO, N. S. et al. Gênero *Salmonella*: Características epidemiológicas e laboratoriais. **Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)**, p.01-67, 2008.

LIBBY, S. J. et al. *Salmonella*. In: GYLES, C. L et al. **Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 3. ed., p.143-160, 2004.

LILLARD H.S. The Impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal Food Protection. Des Moines**. 53(3):202-204., 1990.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK,D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 12 ed. , 324-326p., 1054p., 2010.

MARQUEZI, M. C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água**. 2010. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

MARRAS, A.E.S. Interactive Fluorophore and Quencher Pairs for Labeling Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. **Molecular Biotechnology**: v.38, cap.3, p.247-255, 2008.

MARTINS, C. Sistema de detecção de fluorescência do PCR em tempo real. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, 2014.

MULLER Kauffmann tetrathionate broth. **International Journal Food Microbiology**. Amsterdam, v.5., p.237-239, 1987.

NASCIMENTO, V. P. et al. Salmoneloses paratíficas: uma revisão e situação atual. **In: Simpósio técnico de produção de ovos**. APA, 6., São Paulo, p.93-116, 2011.

OLIVEIRA, G. **Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. no processo de fabricação de farinha de vísceras, destinadas à fabrica de rações para aves**. 2000. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

OLIVEIRA, W. F. de. **Isolamento de tipificação de *Salmonella* da cadeia produtiva de frango de corte da região metropolitana de Fortaleza-CE**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. 2004.13 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Five Keys for Safer Food Manual. 2006. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual\\_keys\\_portuguese.pdf](http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf)> Acesso em: 20 abr. 2015.

PAVIC A., GROVES P.J., BAILEY G. & COX J.M. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. **Journal of Applied Microbiology**. 109:25-34, 2009.

POPOFF, M. Y.; LEMINOR, L. Antigenic Formulas of Salmonella Serovars.7<sup>a</sup> Revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. **Institute Pasteur, Paris**, France, 1997.

RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) broth. **International Journal Food Microbiology**. Amsterdam, v.5, p.254-255, 1987.

RODRIGUES C.I.C.; GUINÉ R.P.F., CORREIA P.M.R. **Manual de Segurança Alimentar – Da Origem ao Consumo**. Edições Técnicas. Porto: Publindústria, 2015, 167 p.

SANTOS, L. A. G.; PINTO, P. S. A.; MORAES, M. P.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. **Pesquisa Molecular e Convencional de *Listeria monocytogenes* para o controle de qualidade de carne suína**. Ceres. Minas Gerais. v. 53, n. 308, p. 481-486, 2006.

SANTOS. L. A. **Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. na tecnologia de abate de frangos de corte**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Bioexperimentação), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2015.

SHERROD, P. S.; AMAGUANA, R. M.; ANDREWS, W.H. et al. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high moisture foods. **Journal AOAC International**, v.78, n.3, p.679-690, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Varela, 2007, p.61-62.

TORTORA G.J., FUNKE B.R., CASE C.L. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Artmed, p. 827, 2000.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. **Relatório Anual Ubabef 2014**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

Vieira AR, *et al.* A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. **WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank**. In: ISVEE Conference. Durban, South Africa: 2009.

WELKER, C. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>> Acesso em: 31 set. 2015.

ZHAO, S.; WHITE, D.G.; FRIEDMAN, S.L.; GLENN, A.; BLICKENSTAFF, K.; AYERS, S.L.; ABBOTT, J.W.; Hall-Robinson, E.; McDermott, P.F. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and environmental microbiology**, v.74, n.21, p.6656-6662, 2008.

(quebra seção > página ímpar)



**APÊNDICE A – Artigo científico**

## Detecção de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real em amostras de abatedouros avícolas

### Detection of *Salmonella* spp. in poultry slaughterhouses samples by real-time PCR

Eduarda Boff Martelo<sup>1\*</sup>, Isabel Cristina Cisco<sup>2</sup>, Denise Cristina Tedesco<sup>3</sup>, Raíssa Canova<sup>2</sup>, Rafael Frandoloso<sup>2</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>1,2</sup>, Luciana Ruschel dos Santos<sup>1,2</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. PPGCTA/UPF.
2. Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo. PPGBIOEXP/UPF.
3. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC CNPq. Curso de Engenharia de Alimentos/UPF.

\*Autor para correspondência: dudamartello@yahoo.com.br

### Resumo

O gênero *Salmonella* é responsável por uma zoonose conhecida como salmonelose e o consumo de produtos de origem avícola é implicado como uma das principais fontes de infecção para humanos. A associação entre *Salmonella* spp. em aves e enterites em humanos decorre da persistência do agente no *habitat* do frango de corte, que proporciona a colonização intestinal assintomática na ave, enquanto o manuseio incorreto de carnes cruas e o consumo de carnes malcozidas são fatores de risco para as doenças transmitidas por alimentos. Métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis e específicos são necessários tanto para a indústria alimentícia quanto para as agências reguladoras e a PCR em tempo real é uma alternativa aos métodos convencionais para identificar *Salmonella* spp. Neste trabalho utilizou-se a PCR em tempo real para identificar a contaminação por *Salmonella* spp. desde a chegada dos frangos até os produtos finais em abatedouros sob Inspeção Federal. As amostras foram oriundas de diferentes pontos da tecnologia de abate previamente coletados e considerados positivos para *Salmonella* por técnicas microbiológicas (microbiologia convencional/MC e Número Mais Provável miniaturizado/mNMP), o que configurava o lote como positivo para o agente. Foram avaliadas 139 amostras em 5 lotes, das quais 27 (19%) foram positivas para *Salmonella* spp. por MC e mNMP e 68 (49%) por PCR em tempo real, configurando a sensibilidade da técnica e a necessidade de adoção de medidas como Boas

Práticas de Fabricação para minimizar a contaminação pela bactéria nos abatedouros avaliados.

**Palavras-chave:** PCR em tempo real, *Salmonella* spp., frangos de corte, abatedouros.

### **Abstract**

The genus *Salmonella* is responsible for a zoonosis known as salmonellosis and consumption of poultry products is implicated as a major source of infection for humans. The association between *Salmonella* spp. in poultry and enteritis in humans arises from the persistence of the agent in broiler habitat, which provides the asymptomatic intestinal colonization in the bird while the improper handling of raw meat and the consumption of undercooked meats are risk factors for foodborne illness. Methods for rapid diagnosis, sensitive and specific, allowing detecting of bacteria are required for both the food industry and for the regulators and real-time PCR are an alternative to conventional methods to recognize *Salmonella*. In this work were used real-time PCR to identify contamination by *Salmonella* spp. since the arrival of poultry to the final product in slaughterhouses under federal inspection. The selected samples were previously collected from different parts of the slaughter technology and considered positive for *Salmonella* by microbiological techniques (conventional microbiology/ CM and miniaturized Most Probable Number/mMPN). Were evaluated 139 samples in 5 batches, of which 27 (19%) were positive for *Salmonella* spp. by CM and mMPN and 68 (49%) by real-time PCR, setting the sensitivity of the technique and the need of adopting measures such as good manufacturing practices to minimize contamination by the bacteria in slaughterhouses evaluated.

**Key words:** Real time PCR, *Salmonella* spp., poultry, slaughterhouses

## **1 Introdução**

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos é um problema de saúde pública relacionado a graves intoxicações alimentares, sendo a principal responsável por vários surtos ao redor do mundo (WHO, 2013).

Em frangos de corte, a presença de *Salmonella* no trato intestinal, na pele e entre as penas, pode causar a contaminação das carcaças durante o abate e o processamento disseminando assim o micro-organismo até os consumidores finais (DUARTE *et al.*, 2009).

A identificação da contaminação por *Salmonella* desde as granjas até o abatedouro é fundamental para se estimar a extensão da contaminação nos cortes e carcaças de frangos e avaliar a efetividade das boas práticas de produção adotadas nas empresas para controle deste patógeno nos produtos finais. (COLLA *et al.*, 2014).

A reação em cadeia pela polimerase em tempo real é uma modificação da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. Neste sistema, a amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado (MARRAS, 2008). A principal diferença entre o PCR convencional e PCR em tempo real é que o último permite o monitoramento da reação a cada ciclo, mostrando a detecção direta dos produtos de PCR na fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial do DNA alvo (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001; WONG, MEDRANO, 2005).

Desta forma, a técnica de PCR em tempo real foi empregada para identificar *Salmonella* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte e assim mapear os pontos onde pode ocorrer aumento ou redução de uma provável contaminação pela bactéria.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Seleção de amostras para PCR em tempo real

As amostras selecionadas para a execução deste trabalho foram provenientes de projetos que visaram a identificação de *Salmonella* spp. por microbiologia convencional (MC) e/ou quantificação por número mais provável miniaturizado (mNMP) em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte (Santos *et al.* 2015). Os pontos amostrados foram *swabs* cloacais, *swabs* de gaiolas antes e após higienização, carcaças (antes e após escaldagem; após depenagem, lavagem, evisceração, *chiller*, lavagem final, resfriadas a 4°C e congeladas a -12°C por 24 horas, 30 e 60 dias) e água de escaldagem, abastecimento do pré-*chiller*, pré-*chiller* e *chiller*.

As coletas foram realizadas em frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, entre 2011 e 2014, e o critério de seleção das amostras para execução do PCR em tempo real foi positividade para *Salmonella* spp. no abatedouro amostrado, independentemente da técnica utilizada (MC ou mNMP), o que configurava o lote como positivo para a bactéria.

Foram selecionados cinco lotes em quatro abatedouros, totalizando 139 amostras, que estavam armazenadas em Água Peptonada Tamponada 1% e haviam sido aliqüotadas logo após o processamento, sem incubação, sendo congeladas a -18°C até os procedimentos de



extração de DNA e PCR em tempo real. O processamento das amostras para as técnicas microbiológicas foi realizado conforme Santos *et al.* (2015).

## 2.2 Amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real

Previamente a realização da amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real foi construída uma curva padrão (*standard curve*) para determinação do número de cópias de DNA para quantificação absoluta das amostras selecionadas para o experimento. Para a construção desta curva utilizou-se diluições seriadas de uma amostra de DNA com concentrações conhecidas de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Colônias retiradas do Agar PCA foram inoculadas em caldo BHI e incubadas à 37°C *overnight*, sob agitação de 200 rpm. Após, realizou-se a leitura da Densidade Ótica (D.O.) em nano espectrofotômetro (Implen®) (DO<sub>600nm</sub> 0.5) e o conteúdo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em PBS. A DO<sub>600nm</sub> foi ajustada para 1.0 e foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup> utilizando-se 100µL de inoculo em 900µL de PBS. Realizou-se o plaqueamento das diluições em ágar PCA e incubação a 37 ± 1°C por 24 horas destas diluições para confirmação das células viáveis de *Salmonella* Typhimurium.

## 2.3 Extração de DNA genômico para determinação da curva padrão

Para extração de DNA utilizou-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) conforme orientações do fabricante, sendo 1 mL da cultura *overnight* com DO<sub>600nm</sub> 1.0 transferida para micro tubo e centrifugada a 11.700 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 600 µL de *Nuclei Lysis Solution*. Em seguida, incubou-se a 80°C por 5 minutos para lise das células e adicionou-se 3 µL de *RNase Solution* quando o micro tubo atingiu temperatura ambiente. Incubou-se a amostra a 37°C por 15 minutos e adicionou-se 200 µL de *Protein Precipitation Solution* ao lisado de células. Após homogeneização em vórtex incubou-se em gelo por 5 minutos e centrifugou-se a amostra a 11.700 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo micro tubo com 600 µL de isopropanol e homogeneizou-se por inversão até a formação de uma massa visível de DNA em forma de fitas. Centrifugou-se a 11.700 rpm por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de etanol a 70%. A amostra foi novamente centrifugada a 11.700 rpm por 2 minutos e o etanol aspirado, a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, permitindo a secagem do *pellet*. Adicionou-se 30 µL de *H<sub>2</sub>O free RNase and DNase* e estocou-se o DNA extraído entre 2 e 8°C negativos.

## 2.4 Amplificação de *Salmonella* Typhimurium para determinação da curva padrão

A partir do DNA com DO 1.0 retirou-se 3µL e inseriu-se em micro tubos contendo 27 µL de *RNase-free water*, realizando-se diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-9</sup>. Após, 1 µL de cada diluição foi transferido para 10 micro tubos, em duplicata, adicionados de 9 µL de água para

PCR e 10  $\mu\text{L}$  do *mix* de reação (*Reconstituted mericon Assay*). O controle negativo foi preparado em micro tubo contendo 10  $\mu\text{L}$  do *Reconstituted mericon* e 10  $\mu\text{L}$  de água para PCR e o controle positivo por 10  $\mu\text{L}$  do *Reconstituted mericon Assay* e *Dissolved Positive Control DNA*. Todos os micro tubos foram acondicionados no Rotor GeneQ®, da Qiagen, e realizada a programação do equipamento para a reação de PCR em tempo real com uma etapa inicial para ativação DNA polimerase (5 minutos a 95°C), desnaturação (15 segundos a 95°C), anelamento (15 segundos a 60°C) e extensão por 10 segundos a 72°C.

### 2.5 Extração de DNA das amostras selecionadas

Para a extração do DNA utilizou-se *kit* comercial denominado *mericon DNA Bacteria Kit* (Qiagen®), que é baseado em uma lise mecânica e uma lise térmica (por fervura), que proporciona a ruptura e extração do DNA de diferentes tipos de bactérias. Alíquotas de 1 mL das amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de lise denominada *Fast Lysis Buffer* ao *pellet* bacteriano, centrifugando-se a 13000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi lavado por cinco vezes e os *ependorfs* colocados em bloco térmico a 100°C por 10 minutos, com agitação de 800 rpm. Após, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos e novamente centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram armazenadas em *freezer* a -80°C para a realização da PCR em tempo real.

### 2.6 Amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real

Para a amplificação de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real utilizou-se o *mericon Salmonella* spp. *kit* (Qiagen®), designado para a detecção da bactéria em alimentos. Este *kit* é composto pelo *Multiplex PCR Master Mix*, que contém a enzima DNA polimerase *HotStarTaq Plus*, solução tampão de PCR, *mix* de dNTP, *primers* e sondas específicas para amplificação da sequência alvo, além do controle positivo de DNA.

A reação de amplificação foi composta por 20  $\mu\text{L}$ , sendo 10  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA a ser amplificada e 10  $\mu\text{L}$  do *mix* de reação. As condições de amplificação foram: aquecimento por 5 minutos a 95°C para ativação da DNA polimerase *HotStarTaq Plus*, 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 60°C e extensão por 10 segundos a 72°C em *Rotor-gene* (Qiagen®).

### 5 3 Resultados e Discussão

Os resultados da curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 estão expressos na Figura 1.

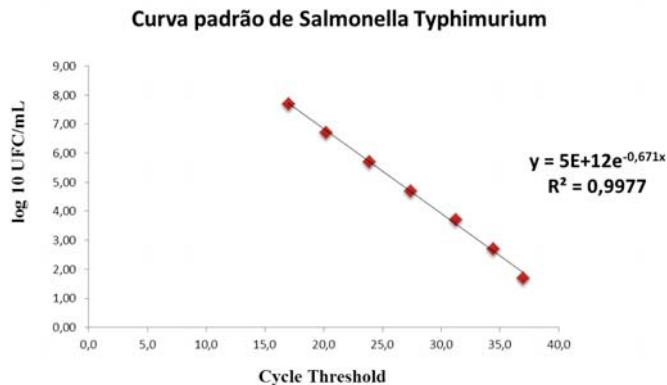


Figura 1 - Curva padrão para quantificação de DNA por PCR em tempo real com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Na Figura 1 está demonstrada a relação entre as contagens de colônias ( $\log_{10}\text{UFC/mL}$ ) e os pontos que detectam os ciclos nas quais as reações atingem o limiar da fase exponencial (*Cycle threshold*, *Ct*). Essa relação foi posteriormente utilizada para identificar a amplificação de DNA de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas, que conforme os resultados da curva padrão deveriam mostrar um *Ct* entre 17 e 37. Os valores de *Ct* relativos as contagens em UFC/mL e conversão para  $\log_{10}$  UFC/mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  de *Salmonella* Typhimurium utilizadas para construção da curva padrão. Deste modo, uma amostra naturalmente contaminada com estes valores de referência teria amplificação de DNA de *Salmonella* spp. e seria considerada positiva.

Foram previamente amostrados cinco lotes com coletas em diferentes pontos do fluxograma de abate de frangos de corte, totalizando 139 amostras, das quais 68 (49%) apresentaram positividade para *Salmonella* spp. pelo método de PCR em tempo real, 15 (10,8%) por Microbiologia Convencional (MC) e 12 (8,6%) por mNMP (Quadro 1).

Quadro 1 - Relação de amostras positivas para *Salmonella* spp. em cinco lotes avaliados por Microbiologia Convencional (MC), Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) e PCR em tempo real.

Coleta	Amostras avaliadas por coleta	Positividade para <i>Salmonella</i> spp.		
		MC	mNMP	PCR em tempo real
<b>1 (C15)</b>	12	0 (0%)	1 (8,3%)	8 (67%)
<b>2 (C20)</b>	15	1 (6,7%)	0 (0%)	10 (67%)
<b>3 (C19)</b>	40	2 (5%)	1 (2,5%)	13 (32,5%)
<b>4 (LA)</b>	36	6 (16,7%)	10 (27,8%)	29 (80,5%)
<b>5 (LF)</b>	36	6 (16,7%)	0 (0%)	8 (22%)
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>15 (10,8%)</b>	<b>12 (8,6%)</b>	<b>68 (49%)</b>

O Quadro 1 mostra a sensibilidade do método de PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* spp. em amostras isoladas de abatedouros avícolas, com destaque para o lote 4, com 80,5% (29/36) de positividade para a bactéria.

No lote 1 foram avaliadas 12 amostras, das quais nenhuma foi positiva por MC e uma foi positiva por mNMP. Já por PCR em tempo real foram identificadas 8 (67%) amostras positivas para *Salmonella* spp., demonstrando a sensibilidade deste método. O mesmo ocorreu no lote 5, onde avaliou-se 36 amostras, das quais 6 (16,7%) foram positivas por MC, nenhuma por mNMP e 8 (22%) por PCR em tempo real.

Os resultados do lote 4 (N = 36) apontaram 6 (16,7%) amostras positivas por MC, 10 (27,8%) por mNMP e 29 (80,5%) por PCR em tempo real. É importante destacar que dentre estas 29 amostras positivas, 13 foram previamente consideradas negativas pelos métodos de Microbiologia Convencional e mNMP, mostrando a importância de um método molecular de identificação aliado à microbiologia convencional.

Neste sentido, O'Regan *et al.* (2008) testaram um ensaio de PCR *multiplex* em tempo real para a detecção de múltiplos sorovares de *Salmonella* em cortes de frango onde a PCR foi tão sensível quanto a microbiologia convencional para detecção de *Salmonella*, porém de forma mais rápida e simples, habilitando-se para identificação de *Salmonella* em laboratórios de análise de alimentos.

Com relação aos métodos microbiológicos, é importante esclarecer que células inviáveis podem ser detectadas por PCR (HERMAN, 1997; MCKILLIP *et al.*, 1999; NOGVA *et al.*, 2003 *apud* RUDI *et al.*, 2007), o que não ocorre em métodos tradicionais de cultura e isolamento, que requerem a viabilidade celular e conseqüente multiplicação em meios de cultura.

Do mesmo modo, Pochop *et al.* (2012), realizaram uma contaminação artificial de produtos cárneos e verificaram a contaminação por *Salmonella* spp. utilizando o PCR em tempo real e observaram genes de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, concluindo que a PCR em tempo real seria útil, rápida, reprodutível, simples e sensível para detectar ácidos nucleicos. Igualmente, Richter *et al.* (2014) testaram 58 amostras isoladas de aves com a provável ocorrência de *Salmonella* spp. e, com a metodologia de PCR em tempo real, identificaram 79,3% de positividade (46/58).

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real também mostrou ser um método rápido e sensível na detecção de agentes patogênicos para Gonçalves (2014), que avaliou o limite de detecção da técnica para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, demonstrando a boa sensibilidade da técnica de PCR, com 2 e 5 UFC/g, respectivamente.

Ao se avaliar os resultados do lote 2 (N = 15) verificou-se que uma amostra foi positiva por MC e nenhuma por mNMP, enquanto na avaliação por PCR em tempo real 10 amostras (67%) foram positivas para *Salmonella* spp. Porém, um dos pontos amostrados (*swab* de gaiolas de transporte após lavagem) foi positivo por MC mas apresentou resultado negativo na metodologia de PCR em tempo real.

Embora haja superioridade no número total de amostras positivas para *Salmonella* pela técnica de PCR em tempo real também ocorreram divergências no lote 3, quando foram analisadas 40 amostras, das quais duas (5%) foram positivas por MC, uma por mNMP (2,5%) e 13 (32,5%) por PCR em tempo real. Entretanto, dois pontos positivos por métodos microbiológicos (carcaças após lavagem, positivo por MC; carcaças após o resfriamento, positivo por mNMP) foram negativos na análise por PCR em tempo real. Nestes casos, as discrepâncias de resultados entre os métodos podem ter ocorrido devido ao limite de detecção determinado pela quantidade de material que pode ser amplificado em uma única reação ou pelos volumes diminutos utilizados na PCR em tempo real.

A presença de *Salmonella* spp. em carne de aves e materiais avícolas têm sido relatada em várias pesquisas. Segundo Carvalho *et al* (2005), 13,3% de 45 amostras analisadas não atenderam ao padrão de ausência de *Salmonella* em 25g de produto analisado, conforme estabelecido pela legislação (Brasil 2001), estando, portanto, impróprias para o consumo. Silva *et al.* (2004) relatam a presença do microrganismo em 13 de 68 amostras analisadas e Almeida Filho *et al.* (2003) constatou 18 amostras contaminadas por *Salmonella* spp. dentre 40 analisadas.

Medeiros (2013) detectou *Salmonella* spp. em abatedouros avícolas com *swabs* em vários pontos da tecnologia de abate de frangos de corte por PCR convencional e PCR em tempo real, constatando que a PCR em tempo real foi capaz de identificar maior número de

amostras positivas (7,3%) em comparação à PCR convencional (1,6%), concluindo que a PCR em tempo real pode agilizar o diagnóstico laboratorial.

## Conclusão

Nos abatedouros avícolas, para o melhor rastreamento de *Salmonella* spp. e redução de resultados falso negativos, indica-se a combinação de métodos microbiológicos convencionais e métodos moleculares para identificação da bactéria.

## Referencias

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa número 78**. Programa Nacional de Sanidade Avícola, 2001. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/Manual.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual.pdf)>. Acesso em: 7 mai. 2015.

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

COLLA, F.L. *et al.* Miniaturized Most Probable Number for the Enumeration of *Salmonella* sp in Artificially Contaminated Chicken Meat. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.16, n.1, p. 45-48, 2014.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.3, p.569-573, 2009.

GONÇALVES J. S., CHEIRUBIM A. P, BRITO K. C. T., BRITO B. G. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de Técnica de PCR. **Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**. Umuarama, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

MARRAS, A.E.S. Interactive Fluorophore and Quencher Pairs for Labeling Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. **Molecular Biotechnology**: v.38, cap.3, p.247-255, 2008.

MEDEIROS N. X. **Detecção molecular de *Salmonella* sp. em amostras avícolas**. Dissertação (Mestrado em ciência animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

NOVAIS C. M., ALVES M. P., SILVA F. F. Pesquisa PCR em tempo real: Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 3, 2004.

O'REGAN E. *et al.* Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1-11, 2008.

POCHOP J. *et. al.* Application of Real-time PCR for Rapid Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and Enteritidis in Food Samples of Animal Origin without Pre-enrichment and with Pre-enrichment. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, v.1, p. 341-345, 2012.

RICHTER, P., IKUTA, N. Análise da sensibilidade analítica das técnicas de PCR convencional e em tempo real para detecção de *Salmonella* spp. In: Simpósio do conhecimento, formação e inovação – Salão UFRGS. 25º, 2014, Porto Alegre: UFRGS

RUDI K., NATERSTAD K., DROMTORP S.M.; HOLO H.; Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. **Letters in applied microbiology**. v.40, p. 301-306, 2005.

SANTOS. L. A. **Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. na tecnologia de abate de frangos de corte.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Bioexperimentação), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2015.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness.** 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>> Acesso em: 31 set. 2015.