

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**EQUIVALÊNCIA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO
OFICIAL PARA DETERMINAÇÃO DE *Salmonella*
Enteritidis e Typhimurium EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS AVÍCOLAS**

Letícia Ríspoli Coelho
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**EQUIVALÊNCIA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO
OFICIAL PARA DETERMINAÇÃO DE *Salmonella*
Enteritidis e Typhimurium EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS AVÍCOLAS**

Letícia Ríspoli Coelho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

Uberlândia – MG

Agosto – 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C672e Coelho, Letícia Ríspoli, 1986-
2012 Equivalência de métodos alternativos ao oficial para determinação de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium em amostras ambientais avícolas / Letícia Ríspoli Coelho. -- 2012.
67 f. : il.

Orientador: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. *Salmonella* Enteritidis - Teses. 3. *Salmonella* Typhimurium - Teses. 4. Aves domésticas - Doenças. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LETÍCIA RÍSPOLI COELHO – Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 30 de setembro de 1986, filha de Ivan Guimarães Coelho e Maria Aparecida de Paiva Ríspoli Coelho. Médica Veterinária, graduada em 11 de julho de 2009 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Em 2010, iniciou o Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Produção Animal, no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2011 a fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos e me permitir chegar ao final dessa etapa.

Aos meus pais e meu irmão, as pessoas mais importantes do mundo, pelo amor impossível de descrever, por me apoiarem em tudo que acredito e pelo incentivo de sempre.

Ao Bruno, meu amor e companheiro de todas as horas, que esteve comigo até quando estávamos longe, me compreendendo e me ajudando nas horas difíceis.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi, por acreditar em mim na realização desse trabalho, me dando essa oportunidade única. “Daisinha”, muito obrigada pela ajuda, paciência, orientação e amizade.

À minha co-orientadora, Dr^a. Simone Alves Mendes Ribeiro, sem a sua parceria não seria possível realizar esse trabalho. Só tenho a agradecer pela disposição em me ajudar sempre, pela amizade e carinho.

Aos amigos do LABIO, Roberta, Eliane, Priscila, Bia, Guilherme e Eduardo, que durante esse período foram fundamentais na minha formação, mesmo com a distância contribuíram com ajuda e torcida na realização do meu trabalho.

Ao pessoal do LANAGRO-SP, pela oportunidade de realização desse estudo. Agradeço em especial à Rose, Shirley, Carla, sem vocês eu não conseguiria! A todos da “Aviárias” e “Biossegurança”, pela colaboração na prática, e por fazer com que meu período em Campinas fosse bem mais divertido.

À Margarida Zaroni, pela colaboração na realização das análises estatísticas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo geral	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O gênero <i>Salmonella</i>	4
2.2 <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva de frangos	5
2.3 Salmonelose e saúde pública	7
2.3.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i>	8
2.4 Métodos de diagnóstico	11
2.4.1 Método tradicional de referência	11
2.4.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (ISSO 6579, 2002)	12
2.4.3 Sistema BAX®	15
2.5 Comprovação de desempenho da metodologia.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local, amostras e cepas	19
3.2 Preparo das amostras de fezes e propé.....	20
3.3 Protocolos de análise	22
3.3.1 Método tradicional de referência	22
3.3.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (ISO 6579, 2002)	24
3.3.3 Sistema BAX®	25
3.4 Procedimento experimental	27
3.4.1 Estabelecimento do inóculo experimental e preparo das	

cepas para fortificação	27
3.4.2 Equivalência entre os métodos tradicional de referência, MSR/V e Sistema BAX® para detecção de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i>	28
3.4.3 Limite de detecção do Sistema BAX®.....	29
3.5 Análise dos resultados	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização das cepas	31
4.2 Estabelecimento do inóculo experimental	33
4.3 Número de células inoculadas em cada fortificação	34
4.4 Equivalência entre os métodos tradicional, MSR/V e Sistema BAX® para determinação de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> em amostras ambientais	35
4.4.1 Repetibilidade e reprodutibilidade	39
4.4.2 Sensibilidade, especificidade e acurácia	41
4.4.3 Sensibilidade, especificidade e acurácia relativas	45
4.5 Teste de conformidade entre resultados fornecidos pelo método de referência e os métodos alternativos Sistema BAX® e MSR/V para avaliação de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> em amostras ambientais	48
4.6 Limite de detecção do Sistema BAX®	50
4.7 Considerações	52
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFNOR – *Association Française de Normalisation*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
ATCC – *American Type Culture Collection*
APT – Água Peptonada Tamponada
BAM – *Bacteriological Analytical Manual*
BHI – Caldo de Infusão de Cérebro e Coração
BPF – Boas Práticas de Fabricação
BPLS – Ágar Verde Brilhante Modificado
CE – Comissão Européia
H₂S – Ácido Sulfídrico
ISO – *International Standard Organization*
LANAGRO-SP – Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo
LIA – Ágar Lisina e Ferro
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSRV – Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado
NPIP – *National Poultry Improvement Plan*
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
PBS – Solução Salina Tamponada
PCA – Ágar de Contagem em Placas
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
PNSA – Plano Nacional de Sanidade Avícola
PRP – Programa de Redução de Patógenos
RV – Caldo Rappaport-Vassiliadis
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SAS – *Statistical Analysis Systems*
SPF – *Specific Patogen Free*
SIF – Serviço de Inspeção Federal
SIM – Meio Sulfito, Indol e Motilidade
TT – Caldo Tetracionado com Iodo

TT Hajna – Caldo Tetrionato Hajna com Iodo

TSI – Ágar Ferro e Açúcar Tríplice

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

VNC – Viável Não Cultivável

XLD – Ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Identificação bioquímica preliminar de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> .	23
Tabela 2 - Recuperação de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> pelo método tradicional de referência após inoculação em séries de dez tubos.	33
Tabela 3 - Número de células de <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Enteritidis</i> utilizadas para fortificação das amostras em cada uma das etapas do experimento (repetições).	35
Tabela 4 - Resultados obtidos em amostras de propé fortificadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSRV.	36
Tabela 5 - Resultados obtidos em amostras de propé fortificadas com <i>Salmonella</i> Typhimurium (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSRV.	37
Tabela 6 - Resultados obtidos em amostras de fezes fortificadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSRV.	38
Tabela 7 - Resultados obtidos nas amostras de fezes fortificadas com <i>Salmonella</i> Typhimurium (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSRV.	39
Tabela 8 - Repetibilidade e Reprodutibilidade calculados para resultados obtidos em matriz propé inoculada e não	

	inoculada com <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> analisadas pelos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV.	40
Tabela 9 -	Resultados dos cálculos de Repetibilidade e Reprodutibilidade para a matriz fezes inoculada com <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> analisadas pelos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV.	41
Tabela 10 -	Sensibilidade dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV para o diagnóstico de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> em amostras de propé e fezes.	42
Tabela 11 -	Especificidade dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV para o diagnóstico de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> em amostras de propé e fezes.	44
Tabela 12 -	Acurácia dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV através de pesquisa de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> em amostras de propé e fezes.	45
Tabela 13 -	Acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV em relação ao método tradicional de referência, comparadas pela análise de fezes fortificadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> .	46
Tabela 14 -	Acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV em relação ao método tradicional de referência, comparadas por meio de propé fortificado com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> .	47
Tabela 15 -	Teste de conformidade para os métodos alternativos (Sistema BAX® e MSRV) em relação ao método tradicional de referência, para as matrizes de fezes e propé fortificadas com <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>S. Enteritidis</i> .	49
Tabela 16 -	Resultados das análises de amostras inoculadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> , em diferentes	

	níveis de fortificação (diluição 10^{-5} à 10^{-9}), realizadas em triplicata através do Sistema BAX®	50
Tabela 17 -	Taxa de recuperação de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> , analisadas a partir de propé e fezes, em dois níveis de fortificação (diluições 10^{-8} e 10^{-7}), através do Sistema BAX®.	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema do preparo das amostras de fezes, sua distribuição nos caldos BHI, Tetracionato e Rappaport-Vassiliadis para o método tradicional e na água peptonada tamponada para o Sistema BAX® e MSRV.	21
Figura 2 - Esquema do preparo das amostras de propé adicionadas de 80mL de água peptonada tamponada, sua dissociação em frascos para controle positivo e negativo e análise através dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV.	22
Figura 3 - Protocolo utilizado para realização das análises pelo método MSRV.	25
Figura 4 - Protocolos utilizados para realização das análises pelo Sistema BAX® para amostras de propé e fezes.	27
Figura 5 - Esquema de análise das etapas para os dois tipos de matrizes (fezes e propé) e sorotipos (<i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i>) e as metodologias utilizadas para comparação.	29
Figura 6a - Tipificação das cepas <i>Salmonella</i> Enteritidis utilizadas no experimento através do Riboprinter®.	31
Figura 6b - Tipificação das cepas <i>Salmonella</i> Typhimurium utilizadas no experimento por meio do Riboprinter®.	32

EQUIVALÊNCIA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO OFICIAL PARA DETERMINAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS AVÍCOLAS

RESUMO – A infecção de humanos por *Salmonella*, particularmente pelos sorovares Enteritidis e Typhimurium é uma preocupação para a saúde pública mundial. A análise deste patógeno nas fezes e no ambiente das aves é uma forma de monitorar a infecção nos lotes e verificar a necessidade de introdução de controles, havendo recomendação do Regulamento da Comissão Europeia (CE) (n.º 646/2007) de que os lotes de aves sejam analisados para a presença destes em fases anteriores ao abate. Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a pesquisa desses microrganismos em amostras ambientais; entretanto, a maioria demanda um longo prazo para obtenção dos resultados. Assim, é desejável que outros métodos, mais rápidos e práticos tenham seu desempenho verificado para possível implantação na rotina. Objetivou-se, avaliar a equivalência entre os resultados obtidos pelos métodos: BAX®, Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) (ISO 6579) e o método tradicional de referência oficial no Brasil (Portaria 126, MAPA) para pesquisa de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em amostras ambientais avícolas. Amostras de propé e fezes fortificadas com uma média de 100 a 1000 UFC/g de cada sorovar, e as mesmas amostras sem fortificação foram avaliadas pelos três métodos. Foram obtidos 504 diagnósticos e os mesmos analisados quanto à repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e acurácia. Estes índices foram realizados individualmente e em relação ao método tradicional (índices relativos). Os resultados obtidos indicaram que os métodos analisados mostraram desempenho satisfatório e o teste de conformidade verificou correspondência entre os métodos alternativos e o método oficial, o que permite afirmar que as metodologias possuem desempenhos equivalentes.

Palavras-Chave: Sistema BAX®, MSRV, *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

**EQUIVALENCE OF ALTERNATIVE METHODS TO THE OFFICIAL TO
DETERMINATION OF *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* IN POULTRY
ENVIRONMENTAL SAMPLES**

ABSTRACT - The infection of humans with *Salmonella*, particularly by serovars Enteritidis and Typhimurium is a worldwide public health concern. The analysis of this pathogen in birds feces and environment is a way to monitoring the infection in batches and to verify the need of introduction of controls, with recommendation of European Commission Regulation (EC) (No. 646/2007) that lots of birds are being analyzed for the presence of these serovars in phases prior to slaughter. Different methodologies can be used to research these microorganisms in environmental samples, however, most of them demands a long time to obtain the results. Thus, it is desirable that other methods, faster and more practical have their performance verified for possible deployment in routine. The aim was to evaluate the equivalence between the results obtained by the methods: BAX ®, Half Semi-solid Rappaport-Vassiliadis Modified (MSRV) (ISO 6579) method and the traditional official reference in Brazil (Ordinance 126, MAPA) for *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis* in poultry environmental samples. Prope and feces samples fortified with an average of 100 to 1000 CFU/g of each serovar, and the same samples were evaluated without fortification by the three methods. Were obtained 504 diagnoses that were analyzed for the same repeatability, reproducibility, sensitivity, specificity and accuracy. These indices were conducted individually and in relation to the traditional method (relative rates). The results indicated that the methods analyzed showed satisfactory performance and compliance testing verified the correspondence between the alternative methods and official method, which allow us to affirm that the methods have equivalent performances.

Keywords: BAX System®, MSRV, *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*.

1 INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma das zoonoses que mais trazem prejuízos às indústrias de alimentos. Ocupa posição de destaque no campo da saúde pública em todo o mundo, pois apesar de todo o desenvolvimento tecnológico e da adoção de melhores medidas de higiene, é crescente e relevante o número de casos da infecção de homens e animais (PENHA et al., 2008).

A maioria das infecções por *Salmonella* em humanos possuem como agentes etiológicos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, sendo estes sorovares considerados os mais importantes nas infecções humanas. Os sorotipos envolvidos e a prevalência podem variar consideravelmente dependendo da localidade, região ou país e, portanto, deve ser realizado o monitoramento e a identificação dos sorotipos prevalentes de *Salmonella* em infecções de humanos e aves, a fim de desenvolver um programa de controle para cada área (OIE, 2010).

O Brasil é um dos maiores e mais bem-sucedidos exportadores mundiais do setor de carnes. Entretanto, no que diz respeito à carne de frango, esta posição está frequentemente ameaçada pelas restrições tarifárias e não tarifárias, como as taxas de importação e barreiras sanitárias, impostas pelos maiores mercados mundiais (RUBIN; ILHA, 2008).

As projeções do consumo de carne mostram preferência crescente dos consumidores brasileiros pela carne de frango. O crescimento projetado é de 2,7% ao ano no período 2011/2012 a 2021/2022. Isso significa um consumo interno de 12,8 milhões de toneladas daqui a 10 anos (BRASIL, 2012). Quanto às exportações, as projeções indicam elevadas taxas de crescimento para as carnes de frango, bovina e suína. As estimativas projetam um quadro favorável para as exportações brasileiras. As carnes de frango e de suínos lideram as taxas de crescimento anual das exportações para os próximos anos, sendo que a taxa anual prevista para carne de frango é de 3,0%, e para a carne suína de 2,2% (BRASIL, 2012).

A contaminação de produtos avícolas por *Salmonella* nos abatedouros ocorre principalmente pelo contato direto ou indireto com as fezes. Apesar de existir programas para a redução da contaminação das carcaças durante o processo de abate, a disseminação destes microrganismos é de difícil controle, principalmente,

quando o número de aves infectadas é alto. A análise dos lotes antes do abate permite intervenções e implantação de medidas de controle que diminuam os riscos de contaminação das carcaças durante o abate, e a presença da bactéria no ambiente.

Determinar a presença de *Salmonella* nas fezes e no ambiente dos animais é também uma forma eficiente e usual de monitorar a infecção em lotes de animais e pode contribuir para orientar programas de controle. As fezes das aves contaminadas com *Salmonella* é uma fonte importante de disseminação ambiental e infecção de animais sadios (ROSE et al., 2000).

Vários métodos de análise são aprovados por órgãos regulamentadores nacionais e internacionais para pesquisa de *Salmonella* em amostras ambientais. Porém, a maioria deles são laboriosos e morosos, havendo necessidade de um grande número de analistas, vários dias para a obtenção dos resultados e grande espaço físico nos laboratórios. Isto impede muitas vezes, que o número total de análises necessárias sejam realizadas. O Regulamento da Comissão Européia (CE) (n° 646/2007) estabelece como condição para a exportação de aves, que todos os lotes sejam analisados para a presença de *S. Typhimurium* e *S. Enteridis* em todas as fases de produção. Para garantir este monitoramento é necessário que a análise rotineira nas indústrias seja realizada com rapidez e simplicidade, porém, sem comprometer a qualidade dos resultados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar a equivalência das metodologias alternativas Sistema BAX® e MSRV (Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado) (ISO 6579, 2002), em relação ao método oficial brasileiro, descrito na Portaria 126 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento); (BRASIL, 1995), para determinação de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* em amostras ambientais.

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar em amostras ambientais de propé e de fezes frescas:

- o nível de fortificação das amostras de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* por meio do método tradicional de referência (Portaria 126 do MAPA), para utilização em fases seguintes do experimento;

- a presença de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* pelos métodos: tradicional de referência, MSRV e Sistema BAX®, testando os protocolos existentes;

- o nível de detecção de *Salmonella* pelo Sistema BAX®;

- a acurácia, sensibilidade, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade dos métodos: Sistema BAX®, MRSV e tradicional de referência para detecção de *Salmonella* em amostras ambientais;

- a acurácia relativa, sensibilidade relativa, especificidade relativa, repetitividade e reprodutividade dos métodos alternativos (Sistema BAX® e MSRV) em relação ao método tradicional de referência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo. Ele foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon. Pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bacilo curto, Gram negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo, não capsulado, não formador de esporo e móvel (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), com flagelos peritríquios. A temperatura ótima para a multiplicação é de 37°C, mas, crescem entre 5°C e 45°C. Crescem em pH entre 4 e 9, sendo 7 o pH ideal. Os membros deste gênero são oxidase negativos, catalase positivos, indol, urease e Voges Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, lisina e ornitina descarboxilase positivos. A maioria dos sorovares produz H₂S (gás sulfídrico). A glicose e outros carboidratos são metabolizados com produção de gás ácido pela maioria dos sorovares (GAST, 1997; GAST, 2008).

Salmonella enterica e *Salmonella bongori* são as duas espécies que compõem o gênero *Salmonella*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Essas subespécies podem ser diferenciadas bioquimicamente ou por análise antigênica. Bactérias classificadas como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* consistem em 99,5% dos microrganismos isolados deste gênero, sendo de maior relevância clínica e tipicamente isoladas de humanos e animais de sangue quente (GRIMONT; WEILL, 2007).

Além da classificação em espécies e subespécies, existe a classificação das cepas em sorogrupos. A *Salmonella*, assim como outras enterobactérias, possui antígenos O (somáticos) e antígenos H (flagelares). Alguns grupos desta bactéria também possuem o antígeno Vi (capsular) (BRENNER et al., 2000). As subespécies de *Salmonella* são divididas em 50 sorogrupos, classificadas com base no antígeno O. Os dois principais sorogrupos são o B e o D1. No grupo B estão os sorovares como *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*, enquanto que no grupo D1 se destaca a *S. Enteritidis* (POPOFF, 2001).

Atualmente mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* já foram identificados, dos quais mais de 1.400 pertencem a *S. enterica* subespécie *enterica* (CDC, 2007; LIBBY et al., 2008). Na espécie *S. enterica* é encontrada a grande parte de sorotipos causadores de salmonelose em mamíferos, incluindo as que infectam a espécie humana (BRASIL, 2008).

Salmonella Enteritidis e *S. Typhimurium* são os sorotipos são mais encontrados na produção de alimentos para animais; sendo assim, as aves podem ser infectadas por meio da ingestão de ração contaminada, durante o transporte ou pela limpeza ineficaz dos galpões (EFSA, 2010). Esses sorovares raramente causam doença clínica nas aves, mas colonizam o seu intestino, o que leva a excreção no ambiente (BARROW; LOVELL, 1991).

2.2 *Salmonella* na cadeia produtiva de frangos

Em saúde pública, as salmonelas destacam-se com grande importância pela sua ampla e variada ocorrência no homem e em animais (mamíferos, répteis e aves), sendo que as aves ocupam o ponto central na epidemiologia das salmoneloses entéricas, representando um reservatório de grande importância sanitária e de difícil controle. Nestes, o estado de portador é o fator epidemiológico mais destacado e a ausência de sintomas e as dificuldades técnicas para sua detecção, antes ou durante a inspeção no abate, convertem-nos em fonte contínua de contaminação do meio ambiente e, portanto, dos produtos de origem animal (RODRIGUES, 2005).

O consumo de produtos avícolas contaminados com *Salmonella* é uma das fontes mais comuns de gastroenterites em humanos, especialmente pela ingestão de ovos e carne de frango (EFSA, 2009). A infecção do frango ou a contaminação da sua carcaça pode ocorrer em toda a cadeia de produção e são necessários esforços contínuos para reduzir a incidência desse microrganismo na produção avícola (HEYNDRICKX et al, 2002).

As fontes de infecção por *Salmonella* em aves são numerosas. Quando infectadas, as aves e outros animais são, geralmente, portadores inaparentes, mas podem apresentar infecção latente e, menos comumente, estarem clinicamente

doentes. Esses animais podem excretar *Salmonella* nas fezes e ser um grande reservatório, podendo infectar também outros animais, os seres humanos e contaminar o ambiente (POPPE, 2000).

A transmissão da *Salmonella* pode ser iniciada pela contaminação do ovo no trato reprodutivo (transmissão vertical) ou ao passar pela cloaca por contaminação com as fezes, e ao ocorrer a eclosão do pintinho tem-se uma importante fonte de infecção para outras aves e ambiente. A transmissão horizontal ocorre geralmente por via fecal-oral, pois a água e rações contaminadas são importantes veículos de disseminação. O desenvolvimento de estado de portador pode contribuir para a persistência do microrganismo no ambiente e conseqüente disseminação da salmonelose. Outras fontes de transmissão incluem roedores, aves silvestres e outros animais que favorecem a introdução e permanência da bactéria em propriedades avícolas (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Em granjas comerciais de frango de corte, os principais problemas relatados são galpões contaminados e pintos de um dia infectados por *Salmonella* subsp. *enterica* (ROSE et al., 2000; DAVIES e BRESLIN, 2003). Quando pintos de um dia estão contaminados, ocorre uma rápida disseminação da bactéria em todo o galpão, inclusive nos comedouros. De acordo com estudo feito por MARIN et al. (2009), em poucas semanas, quando as aves começam a ter acesso aos comedouros, ocorre também um aumento da excreção de *Salmonella* nas fezes. Então, o restante dos animais ingere a ração contaminada e o galpão poderá estar infectado em poucos dias (HEYNDRICKX et al., 2002).

VAN IMMERSEEL et al. (2004) reportou que frangos infectados com *Salmonella* excretam a bactéria por até 18 semanas. Resultados semelhantes foram obtidos por BEAL et al. (2004), que determinou que independente da idade em que as aves são infectadas, a excreção persiste por até 12 semanas, muito além da idade de abate de frangos de corte.

A infecção das aves pode ocorrer pela presença da *Salmonella* no ambiente de criação e, posteriormente, sua disseminação para o local do abate, contaminando as carcaças e outros produtos, caso o processo não seja realizado com cuidados higiênicos adequados (CARDOSO; TESSARI, 2008). NASCIMENTO et al. (2000)

demonstraram que a carne de frango, mesmo quando o número de aves infectadas com patógenos entéricos é pequeno, pode contaminar toda linha de abate.

Durante o abate e o processamento dos frangos, a presença de *Salmonella*, nos intestinos, pele e penas, resulta em contaminação da carne e seus subprodutos (BRYAN; DOYLE, 1995). Alguns procedimentos como escaldagem, depenagem e evisceração exercem papel fundamental na distribuição microbiana na carcaça de frango durante o processo de abate (HACCP, 1995).

O nível de contaminação por *Salmonella* nas granjas e abatedouro depende ainda de vários fatores de risco, incluindo estação do ano, incubadora de origem, qualidade das rações nas fábricas, medidas de higiene e o manejo dos animais. Portadores assintomáticos também podem infectar outros animais durante o transporte e espera para o abate (CARDINALE et al., 2004).

2.3 Salmonelose e saúde pública

Salmonella é geralmente transmitida por meio da cadeia alimentar, pela ingestão de alimentos de origem animal como ovos, carne de frango, carne suína ou bovina (PIRES et al., 2010). Esses alimentos são os mais correlacionados como veiculadores da salmonelose para seres humanos, embora muitos outros possam ser contaminados secundariamente (EFSA, 2009). Isso faz com que a presença deste microrganismo se torne uma das mais importantes barreiras sanitárias internacionais, pois exige rigorosos programas de controle para diminuir sua incidência e as perdas econômicas na cadeia avícola (ANDREATTI FILHO et al., 2009).

A salmonelose é no Brasil e no mundo, um desafio para a saúde pública. Apesar da subnotificação, a partir da década de 70 tem ocorrido um aumento acentuado e contínuo do número de casos vinculados a determinados sorotipos, os quais variam geograficamente. As toxinfecções alimentares sempre foram uma preocupação na indústria alimentícia e, dentre várias, a salmonelose é considerada uma das doenças mais frequentes (CARDOSO; TESSARI, 2008). Em surtos notificados no Brasil, entre 1999 e 2008, o principal agente etiológico envolvido em

doenças transmitidas por alimentos foi *Salmonella*, sendo responsável por 42,9% dos casos (SVS, 2008).

Em humanos, a patologia decorrente da *Salmonella* se dá pela transmissão fecal-oral que ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados, e grande incidência é encontrada em populações com grande densidade populacional, vivendo em precárias condições higiênico-sanitárias e socioeconômicas (CONNOR; SCHWARTZ, 2005).

A ave é um dos mais importantes reservatórios que pode introduzir a salmonela na cadeia alimentar do homem. O primeiro caso de salmonelose em humanos foi relatado em 1880 quando predominava os casos da intoxicação por *Salmonella* Typhi. Segundo CARDOSO e TESSARI (2008), desde 1940, tem-se registrado um rápido aumento de salmonelas não específicas de humanos e animais, particularmente *Salmonella* Typhimurium e, mais recentemente, *Salmonella* Enteritidis, que é o sorovar mais isolado em casos de toxinfecções alimentares em humanos.

2.3.1 *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*

A grande maioria das infecções de humanos por *Salmonella* são de origem alimentar e os principais sorotipos envolvidos são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representando uma parte importante do problema (OIE, 2011). Muitos sorovares predominantes em surtos humanos são comuns em aves comerciais (FERRIS et al., 2003). No caso de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* há uma clara ligação entre a doença humana e o consumo de produtos avícolas (MEAD et al., 2010).

Nos casos de infecção em humanos e animais, aproximadamente 90 sorovares de *Salmonella* spp. são mais frequentemente envolvidos (BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009). Por outro lado, apesar de todos os sorovares serem potencialmente patogênicos para os seres humanos, alguns encontrados em aves são raramente associados à doença em homens. Um exemplo clássico é a *Salmonella* Sofia, que é frequentemente isolada de frangos na Austrália, mas raramente está envolvida em surtos em humanos (POINTON et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os sorovares Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, Javiana, Oranienburg, Montevideo, Saintpaul, Infantis, Agona e Hadar foram os mais frequentes no ano de 2003, sendo *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* os mais isolados de fontes humanas nas Américas, na Europa e na Oceania (WHO, 2006). Na África, em 2002, os sorovares mais isolados foram Enteritidis, Typhi e Typhimurium. Na Ásia, nesse mesmo ano, Enteritidis e Reisen foram os mais frequentes, com Typhimurium aparecendo em quinto lugar (NEGRETE, 2004). Na Inglaterra, HUMPHREY et al. (1988), verificaram aumento na incidência de infecção alimentar por *Salmonella* spp., a partir dos anos 70 (século XX), *S. Typhimurium* foi o sorovar mais predominante e o consumo de produtos de origem avícola contaminados a principal fonte de infecção para o homem (ANDRIGHETTO, 2006).

A partir de 1993, a *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema de saúde pública no Brasil, visto que era raramente isolada de infecções humanas até 1990. Desde então, sua prevalência tem aumentado e passou a corresponder a mais de 60% dos sorovares isolados no Instituto Adolfo Lutz, a partir de 1995. Alguns autores afirmam que a grande prevalência de *S. Enteritidis* em aves pode estar relacionada com as tentativas de erradicação de *S. Gallinarum* dos plantéis, uma vez que esta excluía por competição o sorovar *S. Enteritidis* (SILVA; DUARTE, 2002).

Além das medidas de biossegurança, existem outras formas de diminuir os riscos de infecção por *Salmonella*. Em alguns países a vacinação das aves é bastante utilizada para controlar principalmente os sorovares de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (MASTROENI et al., 2001). Porém, a vacinação não é considerada um método preventivo adequado por muitos especialistas. O uso de antibióticos não deve ser feito para controle da infecção de *Salmonella* nas aves, porque a eficácia do tratamento é limitada, podendo mascarar a infecção na amostragem, além de produzir resíduos em carnes e ovos e contribuir para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (OIE, 2010).

Algumas estratégias utilizadas para o controle da salmonelose dependem do tipo de criação da ave e do nível de animais infectados dentro do plantel (ANDERSON et al., 1994). Protocolos de prevenção têm sido descritos e podem ser aplicados tanto para plantéis de reprodução quanto para frangos de corte (WIERUP,

2006). As alterações na colonização pela bactéria e a idade do plantel também devem ser consideradas. O objetivo de controlar matrizes e avós é prevenir a transmissão vertical de salmonelas, especialmente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (MEAD et al., 2010).

O Brasil, como grande exportador mundial de carne de aves (BRASIL, 2005), deve estabelecer medidas de controle sanitário cada vez mais rígidas, evitando assim grandes prejuízos devido às perdas indiretas, através de embargos sanitários impostos pelos países importadores.

A aplicação de sistemas de controle de qualidade na indústria de alimentos é uma exigência oficial em diversos países, inclusive no Brasil, que, além da exigência de adoção das BPF (Boas Práticas de Fabricação) (ANVISA, 1997), também exige a implantação do Sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (BRASIL, 1998) e o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003).

O Programa de Redução de Patógenos visa o monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frangos e perus a fim de construir um sistema de informação sobre a contaminação desses produtos. Esse monitoramento é realizado por meio de análises laboratoriais contínuas dos produtos *in natura* provenientes de estabelecimentos de abate registrados no SIF (Serviço de Inspeção Federal) (BRASIL, 2003).

O Regulamento da Comissão Europeia (CE) (n.º 646/2007) tem como objetivo assegurar que sejam tomadas medidas adequadas e eficazes para detectar e controlar as salmonelas e outros agentes zoonóticos em todas as fases da produção, transformação e distribuição de produtos derivados de frangos, especialmente ao nível de produção primária, a fim de reduzir sua prevalência e o risco que constituem para a saúde pública. Segundo o Regulamento (CE) (n.º 2160/2003), essa redução de patógenos nos frangos deve abranger *Salmonella Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Como protocolo de amostragem, a colheita dessas amostras deve ser realizada nos lotes de produção de frangos a campo. Para isso, devem ser colhidas por meio de esfregaços em botas ou meias (propé), garantindo que todas as seções da instalação se encontrem representadas proporcionalmente na amostragem (Regulamento (CE) n.º 646/2007).

2.4 Métodos de diagnóstico

2.4.1 Método tradicional de referência

O procedimento internacionalmente aceito e recomendado para detecção de *Salmonella* é o método microbiológico convencional. Há protocolos de análise pelo método tradicional devidamente validados pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), BAM (*Bacteriological Analytical Manual*) e OIE (Organização Internacional de Epizootias) (OLIVEIRA; 1996). No Brasil, esse método é preconizado pelo PNSA (Plano Nacional de Sanidade Avícola) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e é baseado na Portaria 126 do MAPA (BRASIL, 1995). A metodologia convencional inclui etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios de cultura seletivos, identificação bioquímica e provas de soroaglutinação (MACIOROWSKI et al., 2006).

O pré-enriquecimento é empregado quando se analisa matriz desidratada ou para recuperar células de *Salmonella* (NASCIMENTO et al., 2000). Foi demonstrado que o pré-enriquecimento de amostras de ambiente avícola aumenta a recuperação de *Salmonella* de 10% para 25% (THOMASON et al., 1977). As demais etapas da sequência bacteriológica são elementares.

O enriquecimento em caldo seletivo tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*. Nessa etapa recomenda-se o uso de dois meios de enriquecimento, pois a resistência de *Salmonella* pode ter variação entre cepas. Os meios de enriquecimento mais comuns são os caldos Selenito Cistina, Tetrionato, Rappaport-Vassiliadis e seus derivados, acrescidos ou não de novobiocina (NASCIMENTO et al., 2000).

O plaqueamento seletivo diferencial visa promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* com características típicas que as diferem dos microrganismos competidores, possuindo fatores inibitórios ao crescimento de outras bactérias (RALL et al., 2005). Os testes bioquímicos permitem analisar o perfil metabólico dos microrganismos pesquisados, e os resultados são comparados com

aqueles descritos na literatura, permitindo a sua identificação (OLIVEIRA, 2000). Colônias características de *Salmonella* spp. nesses meios devem ser submetidas ao teste sorológico somático polivalente, para a confirmação (FORTUNA e FRANCO, 2005).

Embora oficialmente recomendada, a metodologia oficial requer de três a 11 dias até que um resultado conclusivo seja atingido. Além disso, as propriedades fenotípicas pelas quais *Salmonella* são identificadas podem não ser expressas, e quando são, podem ser de difícil interpretação, além das células poderem estar em um estado Viável Não Cultivável (VNC) e não serem detectadas (MALORNY et al., 2003).

Existem vários fatores que interferem na detecção de *Salmonella* spp.. Entre eles está a microbiota acompanhante e/ou competitiva que, em se tratando de fezes, encontra-se em um número elevado. Isto torna importante a escolha de uma metodologia que utilize meios de enriquecimento seletivos e não seletivos para o isolamento de *Salmonella* (SCHWARTZ, 1996), propiciando, assim, o aumento do número de células desta bactéria e inibindo o crescimento dos competidores (CHEN et al., 1993).

2.4.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) (ISO 6579, 2002)

Um método para pesquisa de *Salmonella* com o uso do meio semi-sólido seletivo MSRV (Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado) foi descrito e é atualmente recomendado pela ISO (*International Standard Organization*) para amostras ambientais (ISO 6579:2002/DAM). O princípio desta técnica é baseado na motilidade apresentada pela maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* (com exceção dos sorotipos Pullorum e Galinarum), na qual resulta na migração do microrganismo pelo ágar (VOOGT et al., 2001).

Segundo alguns autores, o MSRV é um meio adequado para o isolamento de *Salmonella* de amostras de aves e amostras ambientais (READ et al., 1994). De acordo com a ISO 6579:2002/DAM, este método de isolamento é aplicável para

detecção de *Salmonella* em fezes animais (aves, suínos e bovinos) e amostras ambientais em área de produção primária (como poeira).

O método para pesquisa de *Salmonella* utilizando o MSR/V, que é um ágar de enriquecimento seletivo e diferencial, se destaca devido a sua simplicidade e resposta rápida, sendo que os resultados são obtidos em até 48 horas após o pré-enriquecimento. Entretanto, há necessidade de confirmação dos resultados positivos por meio do plaqueamento em meio seletivo e realização de testes bioquímicos e sorológicos (ISO 6579:2002/DAM). O método foi validado pela AOAC para produtos derivados de cacau (AOAC 993-07) (DE SMEDT et al., 1994), para leite em pó (AOAC 995-07) (BOLDEJIK e MILAS, 1996) e em programas de erradicação de *Salmonella* do Serviço de Saúde Animal da Holanda, sendo aplicado para pesquisa em todos os níveis de produção de carne de frango (DE VRIES, 2003).

O ágar MSR/V surgiu como uma modificação do caldo Rappaport-Vassiliadis. Este meio não contém açúcares e é incubado na temperatura de 42°C (BAIRD et al., 1989). A temperatura de incubação associada à concentração de cloreto de magnésio (2,33%) é suficiente para inibição de *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter diversus*. Há relatos de que modificações como a redução da concentração de ágar de 0,29% para 0,27% aumentaram a zona de migração, bem como o uso de 0,92% de triptose ao invés de triptona, que resultou na formação de zonas de migração maiores (BUSSE, 1995). Estes fatores, combinados com uma temperatura de incubação de 42°C, permitiram condições adequadas para a multiplicação e consequente migração das cepas de salmonela (DE SMEDT et al., 1986).

A migração no MSR/V é caracterizada por uma zona turva esbranquiçada ao redor da gota de inoculação, que pode se espalhar por toda a extensão da placa. Se o meio permanecer de coloração azul, sem formação de zona turva, o teste é considerado negativo (ausência de *Salmonella* móvel). O crescimento de microcolônias em volta da gota não é considerado como migração. O resultado falso-negativo não deve ocorrer com o meio MSR/V, pois a *Salmonella*, ao se mover por quimiotaxia pelo meio, forma os halos de migração que facilitam a visualização de seu crescimento, o que não acontece com os competidores (DE SMEDT et al., 1994).

A adição de novobiocina também é inibitória para bactérias como *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (CHAU; HUANG, 1974). Desta forma a eficiência dessa técnica é decorrente da habilidade da *Salmonella* migrar em um meio altamente seletivo que é conferido pela presença de oxalato de verde malaquita, cloreto de magnésio, novobiocina, temperatura de incubação a 42°C (O'DONOGUE et al., 1992) e pH reduzido, o que minimiza a migração da maioria das *Enterobacteriaceae* móveis, com exceção das espécies de *Salmonella*.

DE SMEDT et al. (1986) demonstraram que um pequeno número de células (60 UFC/mL) podia ser recuperado, mesmo que o número de bactérias competidoras estivesse na ordem de 10⁸ UFC/mL. As cepas de *Salmonella*, se presentes na amostra, formam zonas de migração circular na superfície do meio MSR/V atingindo de 10 a 40 mm de raio em 24 horas de incubação a 42°C, enquanto os demais microrganismos (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*) são totalmente inibidos ou, quando se desenvolvem, as zonas circulares de migração não ultrapassam raios de 4 a 6 mm (DE SMEDT et al., 1986), sendo insignificantes.

As placas positivas apresentam uma cor cinza-esbranquiçada e uma zona turva ao redor da gota inoculada. Se não houver crescimento em 24 horas, as placas devem ser incubadas por mais 24 horas. Após esse período, com uma alça de inoculação deve ser feito o plaqueamento seletivo na superfície de ágar XLD (desoxicolato-lisina-xilose) ou outro meio seletivo, para que sejam obtidas colônias bem isoladas. Para confirmação do resultado devem ser feitos testes bioquímicos (ISO 6579:2002/DAM).

2.4.3 Sistema BAX®

Embora os métodos de cultura tradicionais ofereçam vantagem epidemiológica sobre os métodos moleculares, devido a sua capacidade de detectar células bacterianas viáveis, essas metodologias demandam muito tempo, particularmente quando grandes números de amostras devem ser analisadas (MACIOROWSKI, 2006).

Métodos convencionais de análise ainda são frequentemente usados no isolamento de *Salmonella*, e necessitam de três a 11 dias para serem completados (WALTMAN, 1993). Esses métodos demandam muito tempo e são bastante laboriosos. Métodos moleculares como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permitem amplificação de pequenas porções de DNA (CHENG, 2008) que podem ser usadas na detecção de patógenos de importância veterinária.

Muitas técnicas moleculares de detecção e caracterização de microrganismos envolvem o uso da PCR. O Sistema BAX® (DuPont Qualicon) é um dos primeiros métodos moleculares automatizados aprovados para a detecção de agentes patogênicos usados na análise de alimentos. Esse sistema simplifica o processo da PCR, combinando todos os reagentes necessários (*primers*, DNA polimerase e nucleotídeos) em um único tablete (MROZINSKI, 1998).

A detecção do patógeno pelo Sistema BAX® é feita por um sistema automatizado, que diminui a possibilidade de contaminação cruzada durante a análise. Os resultados são apresentados pelo software em forma de círculos verdes (negativos) e vermelhos (positivos). O programa também detalha os resultados em gráficos onde nas ordenadas são descritas as temperaturas de análise e nas abscissas a absorbância (baseada na fluorescência emitida por uma substância intercalada com o DNA da amostra) (KUSHIDA, 2005).

Em estudo de validação no Brasil, foi feita uma comparação entre o Sistema BAX® e o método oficial utilizado pelo MAPA (Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água – Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003) para detecção de *Salmonella* em alimentos, água e amostras ambientais. Cinco laboratórios se envolveram no estudo, e foram utilizadas amostras de rotina e 70 tipos de produtos foram analisados, totalizando 1988 amostras. O Sistema BAX® apresentou resultados comparáveis ao método oficial (TOMAZELLI et al., 2008), sendo então aprovado para pesquisa de *Salmonella* em alimentos no país. Esta metodologia foi oficializada por meio da Instrução Normativa número 41, de 7 de Julho de 2004 (BRASIL, 2004).

O Sistema BAX® é considerada uma metodologia equivalente a oficial no Brasil para pesquisa de *Salmonella* em alimentos (BRASIL, 2004) e também aprovada e adotada em outros países. É aprovado pela AOAC para pesquisa de

Salmonella para diversos tipos de alimentos, como carne, leite, e produtos derivados de aves (MROZINSKI, 1998).

Essa metodologia de análise de *Salmonella* também é aprovada por governos de países como Estados Unidos, Japão, China, Rússia, Canadá, Arábia Saudita, Chile, México, Uruguai, Colômbia e na Europa (aprovada pela *Association Française de Normalisation* - AFNOR, NORDVAL), entre outros. Outro estudo multilaboratorial foi conduzido nos Estados Unidos para comparação entre o Sistema BAX® e um método padrão de detecção de *Salmonella* em alimentos. Participaram da pesquisa 16 laboratórios representando a indústria e o governo, e foi usado um total de 1386 amostras, envolvendo alimentos como salsicha, carne moída crua, queijo mussarela, tilápia crua e congelada e suco de laranja. Os resultados apresentados pelo Sistema BAX® foram comparáveis aos do método padrão (SILBERNAGEL et al., 2003).

Para pesquisa de *Salmonella* em amostras de sanidade, o Sistema BAX® foi avaliado e aprovado pelo NPIP (*National Poultry Improvement Plan*), nos Estados Unidos, para pesquisa de amostras ambientais, suabes de cloaca, caixa de transporte de pintinhos e amostras de mecônio (USDA, 2012).

2.5 Comprovação de desempenho da metodologia

A necessidade da indústria alimentícia de avaliar rapidamente a qualidade microbiológica de matérias-primas e produtos, assim como os processos de produção e amostras ambientais, levou o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos alternativos de análise microbiológica, que são mais rápidos e/ou mais fáceis do que o método de referência, sendo que alguns podem ser automatizados (ISO 16140, 2003).

De acordo com a ISO 16140 (2003), a validação de um método alternativo é definida como “demonstração de que um método alternativo é confiável, desde que os resultados obtidos por ele sejam comparáveis aos resultados obtidos pelo método de referência”. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), conforme a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 210, validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente leve aos resultados esperados. De acordo

com a Resolução número 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Para avaliar os riscos associados à presença de *Salmonella* nas aves, é importante conhecer a distribuição desse microrganismo nas fezes dos animais, para que seja possível estabelecer sua real incidência na criação avícola. É fundamental compreender essa incidência nos plantéis, a fim de ter um maior controle sobre o processo. Neste contexto, o Conselho do Parlamento Europeu (2003) em uma diretiva sobre vigilância de zoonoses e agentes zoonóticos, exige um sistema de gestão de qualidade para execução dos seus programas de monitoramento.

A detecção de espécies de *Salmonella* é baseada em metodologias microbiológicas tradicionais que são amplamente utilizadas em laboratórios de análise. Estas técnicas apresentam várias dificuldades, como a subjetividade na interpretação de algumas provas bioquímicas ou morfológicas, a possível interferência de matrizes, especialmente quando apresentam alto nível de contaminação, alto custo do método, tanto em termos de mão de obra quanto equipamentos e, principalmente, o longo tempo para obter resultados definitivos, geralmente três a sete dias, dependendo da necessidade de realizar testes bioquímicos e sorológicos (FERRUS et al., 2009).

A introdução de um método em laboratórios oficiais e privados deve ser precedida de uma validação interna documentada, que demonstre que o método conduz a resultados confiáveis e adequados. Um pré-requisito fundamental para uma metodologia ser reconhecida internacionalmente é que a validação tenha sido realizada. Métodos alternativos devem ser validados de acordo com a ISO 16140:2003 e com a OIE, dependendo do tipo de amostra a ser validada. A validação é um passo importante no processo de padronização de um método porque fornece evidência de que o novo método fornece resultados semelhantes e está de acordo com o método de referência usado. Além disso, a validação confirma sua reprodutibilidade e especificidade quando usado por outros laboratórios (MALORNY et al., 2003).

A maioria dos métodos alternativos disponíveis para pesquisa de *Salmonella* em amostras ambientais só foi validado para análise de alimentos e ração (MALORNY et al., 2009; SAROJ et al.; 2008; MALORNY et al., 2004). Essas matrizes apresentam menor dificuldade para recuperação de *Salmonella* do que amostras de fezes, devido principalmente à presença de microbiota menos competitiva e compostos inibitórios da reação de PCR (KORSAK et al., 2004).

Embora existam relatos indicando que o diagnóstico através de reação de PCR usando amostras de fezes pode fornecer resultados comparáveis aos métodos tradicionais de cultura (ERIKSSON; ASPAN, 2007), é necessária uma avaliação de protocolos de PCR atualmente disponíveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, amostras e cepas

O estudo foi realizado no Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo (LANAGRO-SP), localizado na cidade de Campinas, São Paulo. Para a pesquisa foram utilizadas fezes e amostras ambientais coletadas por propé provenientes de aves SPF (*Specific Patogen Free*).

A coleta do material foi feita respeitando os procedimentos de biossegurança da Unidade de Biotério do LANAGRO-SP. As fezes foram retiradas das bandejas utilizando pinças estéreis e colocadas em um béquer. Após a coleta, o recipiente foi fechado e devidamente transportado para a Unidade de Sanidade Aviária, onde o material foi processado.

Para as amostras ambientais, foram utilizados propés estéreis descartáveis. A bandeja contendo fezes das aves foi retirada da gaiola e, com o propé devidamente colocado, pisou-se na bandeja, simulando uma coleta a campo. Após a coleta, o material foi acondicionado em um recipiente estéril, fechado e transportado para a Unidade de Sanidade Aviária.

Para a fortificação das amostras foram usadas três cepas de *S. Enteritidis*, sendo uma ATCC 13076 (*American Type Culture Collection*) e duas cepas de campo de origem avícola, pertencentes ao banco de cepas do LANAGRO-SP. As três cepas de *S. Typhimurium* também foram isoladas de amostras de campo de origem avícola. Para a adição de *Salmonella* às matrizes de fezes e propé, foi feita uma mistura das cepas de cada sorotipo a fim de simular uma situação de contaminação a campo. Os sorotipos utilizados para inoculação foram previamente caracterizados por meio de provas bioquímicas e tipificados com o uso do RiboPrinter® *Microbial Characterization System* (Qualicon, Wilmington, DE).

O experimento consistiu de três fases. Inicialmente, foi estabelecido o inóculo experimental, para determinar a quantidade de células de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* que seria utilizada nas fases posteriores. Para comparação de metodologias, foram realizadas 12 etapas (repetições), e em cada uma foram fortificadas sete amostras (amostras teste) e sete amostras não foram fortificadas

(amostras controle). A última fase constou da determinação do limite de detecção do Sistema BAX®.

3.2 Preparo das amostras de fezes e propé

O preparo das amostras de fezes foi realizado de forma diferente para o método tradicional de referência (Portaria 126, MAPA) (BRASIL, 1995) e para os métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV (ISO 6579:2002/DAM). Os protocolos de análise de cada método serão descritos no item 3.3.

Pelo método tradicional, o enriquecimento não seletivo foi feito em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (HIMEDIA®) e o enriquecimento seletivo em caldo tetrionato com iodo (TT) (ACUMEDIA®) e caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (ACUMEDIA®) (BRASIL, 1995). Primeiramente, a matriz fezes foi pesada em balança de precisão de 0,01g (MARTE®) e adicionada aos caldos, sendo 2g da amostra pesada individualmente e em duplicata para cada um dos caldos com volume de 20 mL, recomendados para o enriquecimento, exceto para o caldo RV (ACUMEDIA®), no qual pesou-se 0,2g. Uma das duplicatas foi fortificada com 1 mL da diluição estabelecida como inóculo experimental e denominada amostra teste e a outra adicionada de 1 mL de água destilada estéril (amostra controle). Em cada etapa, tanto para amostras fortificadas quanto para as controle, esse procedimento foi realizado sete vezes.

Para análise pelos métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV, o preparo constou da adição de 2g de fezes a 20 mL de água peptonada tamponada (APT) (MERCK®) em duplicata. Após homogeneização, as amostras teste foram adicionadas de 1 mL da diluição estabelecida como inóculo experimental, e as amostras controle adicionadas de 1 mL de água destilada estéril, assim como realizado pelo método tradicional. A figura 1 ilustra a distribuição das amostras de fezes nos caldos, de acordo com o método realizado.

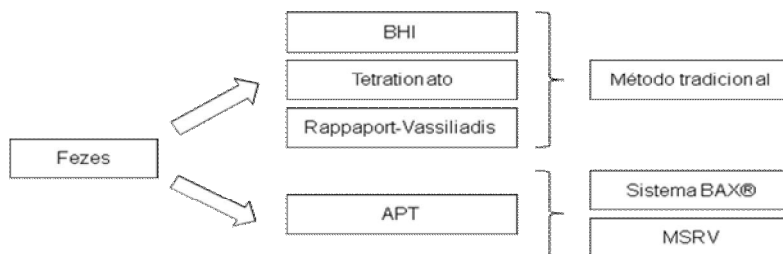


Figura 1. Esquema do preparo das amostras de fezes, sua distribuição nos caldos BHI, Tetrionato e Rappaport-Vassiliadis para o método tradicional e na água peptonada tamponada para os métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV.

No laboratório, cada um dos propés coletados, conforme descrito no item 3.1, foram adicionados individualmente a um béquer que continha 80 mL de APT (MERCK®) e realizada homogeneização do frasco por 25 vezes na rotação do punho. Um volume de 5,7 mL do líquido resultante da mistura de cada béquer foi transferido assepticamente para um tubo de ensaio estéril.

Nas amostras teste foi adicionado 0,3 mL da diluição 10^{-6} (equivalente a 3mL da diluição 10^{-7}) de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, e incubado a 37°C por 20 horas, enquanto que nas amostras controle foi feita a inoculação de 0,3 mL de água destilada estéril em cada um dos tubos, incubados nas mesmas condições das amostras teste. A separação do volume de 5,7 mL em um frasco foi feita para facilitar o processo de inoculação. Depois de incubadas, as amostras foram analisadas pelos três métodos (tradicional de referência, MSRV e Sistema BAX®) (Figura 2).

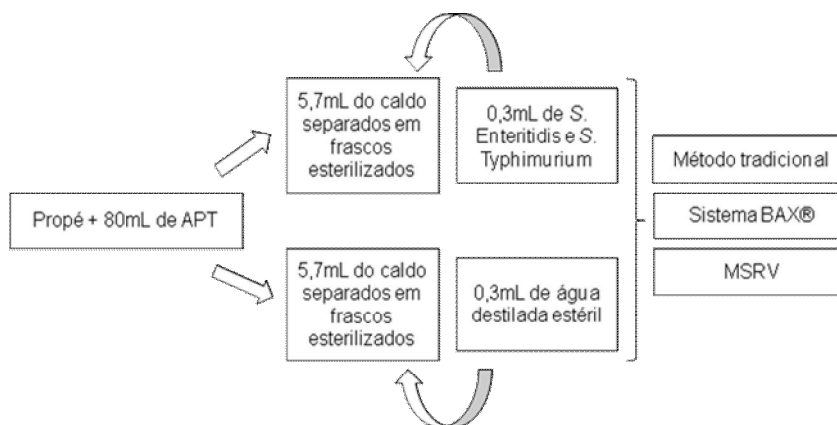


Figura 2. Esquema do preparo das amostras de propé adicionadas de 80mL de água peptonada tamponada, sua dissociação em frascos para controle positivo e negativo e análise através dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV.

O enriquecimento das amostras de propé foi realizado da mesma forma das fezes, tanto para o método tradicional como para os métodos alternativos, porém aqui foi utilizado um volume de 2 mL da amostra preparada para 20mL dos caldos BHI (HIMEDIA®), TT (ACUMÉDIA®) e APT (MERCK®), e 0,2 mL para 20mL do caldo RV, todos em duplicata (amostra teste e controle).

3.3 Protocolos de análise

Para determinar o nível de fortificação das amostras, nas etapas subsequentes do experimento foi utilizado o método tradicional de referência (BRASIL, 1995). O método oficial também foi usado na comparação com as metodologias alternativas (Sistema BAX® e MSRV). Todos os protocolos e metodologias estão descritos a seguir.

3.3.1 Método tradicional de referência

Para análise das amostras de fezes e propé pelo método tradicional, os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Portaria 126 do MAPA (BRASIL, 1995).

As amostras preparadas conforme descrito no item 3.2, foram enriquecidas no caldo não seletivo BHI (HIMEDIA®) e incubadas à 37°C, enquanto as enriquecidas

nos caldos seletivos TT (ACUMÉDIA®) e RV (ACUMÉDIA®) foram incubadas 42°C, todas por 24 horas.

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo (TT e RV) e não seletivo (BHI), o material foi estriado em placas de ágar MacConkey (OXOID®), ágar Hektoen (HIMEDIA®) e ágar BPLS (ágar verde brilhante modificado) (MICROMED®) e incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas e, após, foi verificado o aspecto das colônias desenvolvidas nas placas. As colônias características de *Salmonella*, incolores no ágar MacConkey (OXOID®), verde-azuladas, com ou sem centro-negro no Hektoen (HIMEDIA®), rosadas no BPLS (MICROMED®) foram selecionadas para confirmação.

As colônias selecionadas foram estriadas em ágar Rambach (MERCK®) para confirmação da pureza. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias vermelhas no ágar Rambach (MERCK®) foram selecionadas para testes bioquímicos.

De cada placa foram repicadas 2 a 3 colônias suspeitas no Ágar TSI (ágar ferro açúcar tríplice) (MICROMED®), LIA (ágar lisina e ferro) (MICROMED®), meio SIM (Sulfito, Indol e Motilidade) (HIMEDIA®) e Caldo Uréia (MICROMED®) para identificação bioquímica preliminar. A interpretação foi realizada de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Identificação bioquímica preliminar de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

Comportamento bioquímico		SE e ST
TSI 24 horas	Base	A, gás +
	Bisel	V
	H ₂ S	+
LIA 24 horas	Base	P
	H ₂ S	+
Urease		-
Motilidade		+

SE= *Salmonella* Enteritidis; ST= *S. Typhimurium*; TSI = ágar ferro açúcar tríplice; LIA = ágar lisina e ferro; A = amarelo (ácido); V = vermelho (alcalino); P = púrpura (alcalino). FONTE: BRASIL (1995)

As colônias que apresentaram resultados característicos do gênero *Salmonella* de acordo com a tabela 1 foram confirmadas por provas bioquímicas complementares, incluindo oxidase, catalase, indol, Voges-Proskauer, sulfeto de hidrogênio, citrato de Simons, lisina e ornitina descarboxilase, lactose, sacarose,

maltose, produção de ácidos, malonato, fenilalanina desaminase, provas de vermelho de metila, arginina, manitol, dulcitol e maltose. (BRASIL, 1995).

As cepas que apresentaram perfil bioquímico compatível com os sorovares de *Salmonella* estudados, foram repicadas em ágar nutritivo e incubadas à 37°C por 24 horas. Após incubação, foram caracterizadas antigenicamente através do teste de aglutinação rápida em lâmina com soro anti-somático "O" polivalente de *Salmonella* (PROBAC®). Na amostra em ágar nutritivo, foi adicionado 1 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizou-se. Sobre a superfície de uma lâmina, foi depositada uma gota de solução salina 2%, para verificar se a cultura apresentava rugosidade, e outra de soro anti-*Salmonella* O (PROBAC®). Acrescentou-se uma gota de suspensão bacteriana sobre cada gota do soro anti-somático e homogeneizou-se. A leitura foi feita em 30 a 60 segundos, com iluminação sobre fundo escuro. Na reação classificada como positiva houve presença de aglutinação na mistura cultura e soro anti-*Salmonella*, e na reação negativa apresentou ausência de aglutinação na mistura cultura e soro anti-*Salmonella* O (PROBAC®) (BRASIL, 1995).

3.3.2 Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) (ISO 6579, 2002)

A detecção de *Salmonella* utilizando o MSRV foi feita de acordo com os procedimentos descritos na ISO 6579:2002/DAM (ISO, 2005). As placas de MSRV mantidas em geladeira ($\pm 5^\circ\text{C}$) foram deixadas em temperatura ambiente antes do uso, para evaporar as gotículas da tampa.

As amostras de fezes e propé em APT (MERCK®), preparadas no item 3.2 (teste e controle), foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, foram pipetadas sobre o meio semi-sólido três gotas da amostra com volume de 33 μL cada gota, e distribuídas uniformemente na placa. As placas foram incubadas a 42°C. A formação de halo no MSRV é indicativa de resultado positivo. Uma leitura foi feita com 24 horas de incubação para verificar o crescimento dos halos. Quando não havia apresentação de halo, as placas eram incubadas por mais 24 horas.

Através de uma alça de inoculação de 1mL, as colônias típicas do MSR/V foram coletadas a partir da borda de crescimento do halo e semeadas em ágar Rambach (MERCK®). Para confirmação foram feitos testes bioquímicos e caracterização antigênica, de acordo com a Portaria 126 do MAPA (BRASIL, 1995), descritos anteriormente. A figura 3 descreve o protocolo utilizado para o MSR/V.

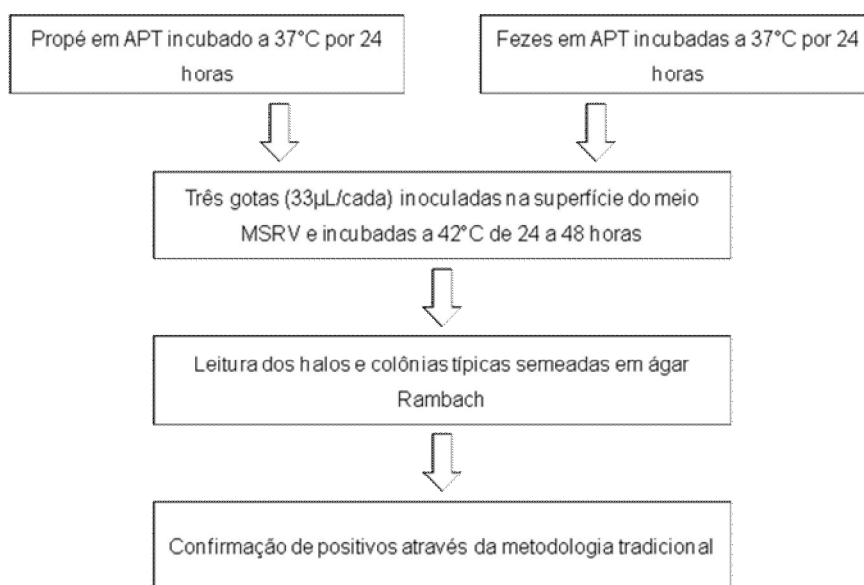


Figura 3. Protocolo utilizado para realização das análises pelo método MSR/V.

3.3.3 Sistema BAX®

O Sistema BAX® de PCR automatizado foi utilizado para verificar a presença de *Salmonella* em propés e fezes, seguindo protocolos de enriquecimento distintos para cada tipo de amostra. Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante (USER GUIDE, 2010).

As amostras de fezes e propé em APT (MERCK®), preparadas no item 3.2 (teste e controle), foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para a matriz propé, foi utilizado o mesmo procedimento recomendado para alimentos, ou seja, da amostra pré-enriquecida em APT (MERCK®), após homogeneização, foram transferidos 10µL para 500µL de BHI (MERCK®), e incubadas a 37°C por 3 horas (“regrowth”) (USER GUIDE, 2010). Após o “regrowth”,

5µL da amostra foi transferida para tubo contendo 200µL de solução de protease em tampão fosfato (reagente de lise).

Para fezes foi utilizado um protocolo indicado pela NPIP (*National Poultry Improvement Plan*), que recomenda o enriquecimento seletivo em caldo Tetrionato Hajna com iodo (TT Hajna) e caldo RV (ACUMEDIA®). Assim, das amostras em APT (MERCK®), conforme descrito no item 3.2, foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para 10 mL de TT Hajna e 0,1 mL foram transferidos para 10 mL de caldo RV (ACUMEDIA®). As amostras no TT Hajna foram incubadas a 37°C por 24 horas e o caldo RV a 42°C por 24 horas. Depois de incubadas, foi feita uma mistura em um tubo estéril dos dois caldos (1 mL de caldo TT Hajna e 1 mL do caldo RV (ACUMEDIA®)). Após esse procedimento, 10µL de cada amostra foi transferido para tubos contendo 200µL do reagente de lise preparado. Esse procedimento foi feito de acordo com protocolo desenvolvido pelo NPIP (APÊNDICE).

Adicionadas as alíquotas das amostras de fezes e propé para tubos contendo tampão de lise, a mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos, para ocorrer a lise celular e digestão de proteínas. Em seguida, a mistura foi aquecida a 95°C por 10 minutos para inativação da protease, e então os tubos de lise foram colocados em um bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante cinco minutos.

Após o resfriamento, 50µL das amostras lisadas foi rapidamente transferido para tubos de PCR contendo os *pellets* com reagentes (*primers*, dNTPs, Taq-DNA polimerase, corante fluorescente, controle positivo interno e demais reagentes necessários para a PCR). Os tubos foram transferidos para termociclador, onde o programa pré-estabelecido no *hardware* do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados na tela do computador. Um esquema dos protocolos utilizados pode ser verificado na figura 4.

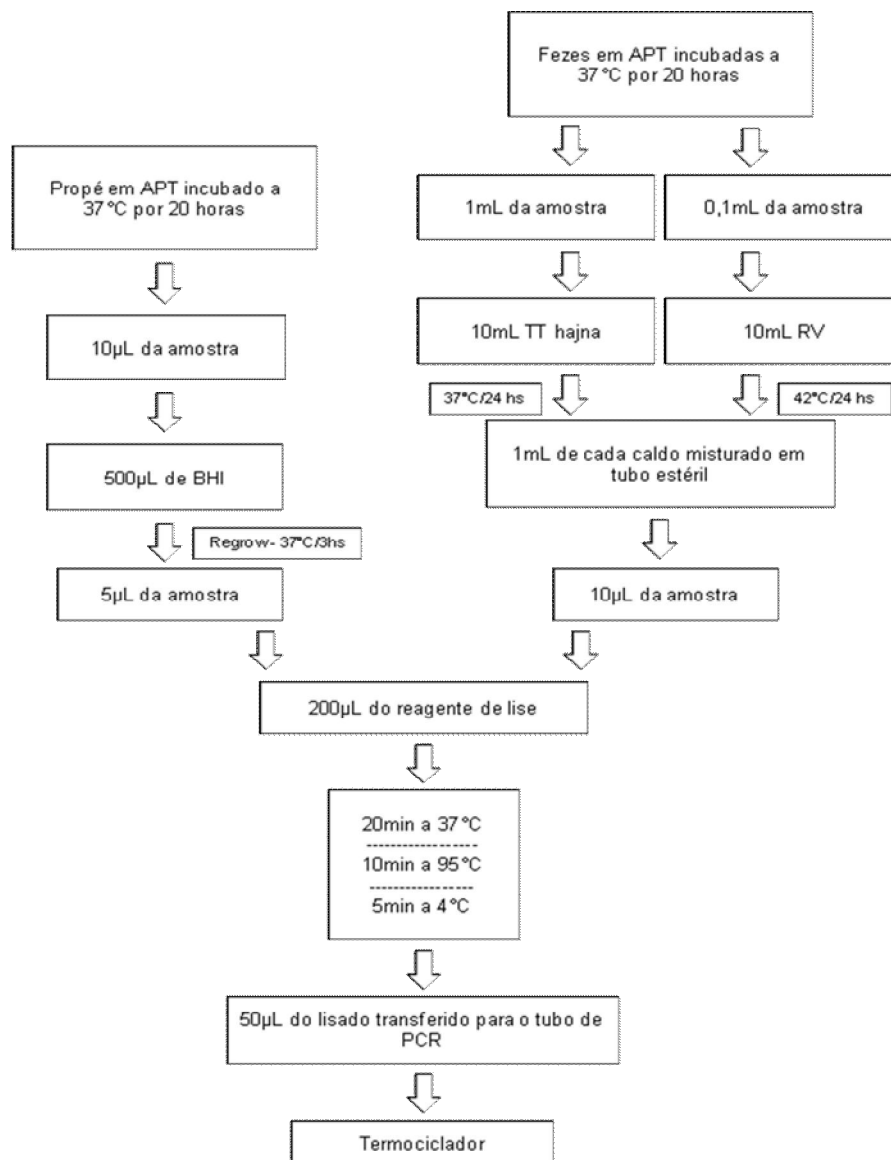


Figura 4. Protocolos utilizados para realização das análises pelo Sistema BAX® para amostras de propé e fezes.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Estabelecimento do inóculo experimental e preparo das cepas para fortificação

Para estabelecer o nível de células de *Salmonella* que seria utilizado no experimento, foi realizada a fortificação individual de dez amostras de fezes, cada

qual testando dois níveis de células de *Salmonella* (diluições 10^{-7} e 10^{-8}), com quatro repetições de cada, realizadas em dias diferentes. Para a fortificação foi utilizada uma associação das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

As três cepas de cada sorotipo foram enriquecidas separadamente em caldo BHI (HIMEDIA®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, 1 mL de cada cepa foi misturado em um tubo estéril e homogeneizado no vórtex. Após, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina tamponada (PBS) estéril, sendo testadas as diluições 10^{-7} e 10^{-8} , correspondentes a 100 à 1000 e 10 à 100 células, respectivamente. Em paralelo, para cada uma das repetições foi utilizado um controle negativo (amostra sem fortificação ou amostra controle).

A confirmação do número de células de *Salmonella* em cada diluição foi realizada por meio da inoculação de cada uma das diluições em sete placas de ágar de contagem em placa (PCA) (BIOAMÉRICA®). Utilizou-se de sete repetições para estabelecer o intervalo real de unidades formadoras de colônias (UFC) inoculadas.

O nível de fortificação das amostras foi estabelecido quando, no mínimo, em cada repetição, em pelo menos 5/10 (50%) das amostras, as células de *Salmonella* foram recuperadas pelo método tradicional de referência (BRASIL,1995).

A diluição usada em cada etapa também foi semeada em ágar Rambach (MERCK®) para confirmação da pureza das cepas. Os resultados foram expressos de acordo com Procedimentos para Contagem de Colônias descrito na Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2003).

Na fase inicial também foram realizados treinamentos para o uso adequado dos métodos a serem testados e selecionados os protocolos adotados para estes métodos.

3.4.2 Equivalência entre os métodos tradicional de referência, MSRv e Sistema BAX® para a detecção de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

Para determinar a equivalência entre os métodos, foram fortificadas sete amostras de cada uma das matrizes (fezes e propé) com os dois sorovares de *Salmonella* (*Enteritidis* e *Typhimurium*), paralelamente, como demonstrado na figura 5. O número de células utilizado foi o definido na fase anterior, no item 3.4.1. As

análises foram realizadas pelos três métodos: tradicional, MSR/V e Sistema BAX®, sendo analisado, em paralelo, o mesmo número de amostras sem fortificação (amostras controle).

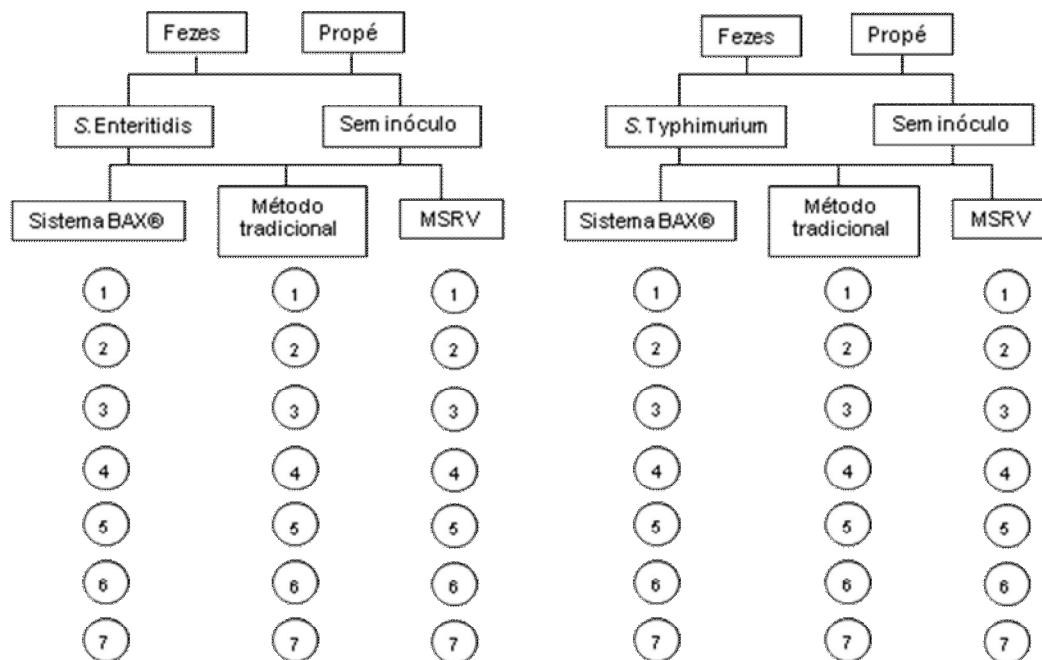


Figura 5. Esquema de análise das etapas para os dois tipos de matrizes (fezes e propé) e sorotipos (*Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*) e as metodologias utilizadas para comparação.

Cada etapa foi realizada no período de uma semana, e para cada uma foram feitas três repetições, totalizando 12 etapas (ou 12 semanas). No total do experimento foram analisadas, pelos três métodos, 504 amostras.

3.4.3 Limite de detecção do Sistema BAX®

O limite de detecção de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* pelo Sistema BAX® foi determinado para as matrizes fezes e propé.

Inicialmente, a APT (MERCK®) foi fortificada com os dois sorovares, separadamente, sem presença de matriz, nas seguintes concentrações: até 10 células (diluição 10^{-9}), de 10 à 100 células (10^{-8}), de 100 à 1.000 células (10^{-7}), de 1.000 à 10.000 células (10^{-6}) e de 10.000 à 100.000 células (10^{-5}). As amostras

foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o “regrowth” por três horas foram analisadas pelo Sistema BAX® em triplicata.

Depois de obtido o limite de detecção do método sem a presença de matriz, foi verificada a menor concentração de células usadas na fortificação suficiente para gerar pelo menos dois resultados positivos na análise em triplicata.

O limite detecção de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* pelo Sistema BAX® foi determinado para as matrizes fezes e propé. Após, 21 amostras de cada uma das matrizes foi fortificada com a concentração determinada e a análise foi repetida conforme descrito anteriormente.

3.5 Análise dos resultados

Para comparação entre os métodos, considerou-se a definição de método alternativo e método de referência segundo a ISO 16140:2003. O método alternativo é o método que demonstra como uma mesma amostra é medida ao utilizar-se o método de referência correspondente, o qual é internacionalmente reconhecido ou largamente aceito. Neste estudo o método de referência foi o método tradicional e como método alternativo consideraram-se os métodos Sistema BAX® ou MSR.V.

Os resultados foram tabulados e calculados a acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa, pelo Setor de Estatística do LANAGRO-SP, através do SAS (*Statistical Analysis Systems*). A utilização do termo “relativo” deve-se ao fato de que o valor de referência é o valor obtido pelo método de referência (ISO 16041:2003). Para avaliar a precisão dos métodos analisados, foram calculadas a repetitividade (medida de conformidade) e reprodutibilidade (medida de correspondência).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das cepas

A caracterização fenotípica das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* por meio de provas bioquímicas mostrou que todas as estirpes utilizadas demonstraram comportamentos característicos do gênero e idênticos, não sendo suficientes para diferenciá-las. As estirpes apresentaram resultados negativos para a produção de indol, reação de Voges Proskauer, descarboxilação da lisina, desaminação da fenilalanina e utilização da lactose e sacarose como fonte de carbono. Os resultados foram positivos nas provas de vermelho de metila, descarboxilação da arginina e ornitina, citrato de Simons, capacidade de fermentar a maltose, dulcitol, D-manitol e D-glicose, sendo o último com produção de ácido e gás.

A tipificação das estirpes de *S. Enteritidis* por meio da ribotipagem no equipamento Riboprinter® demonstrou que as cepas pertenciam ao mesmo ribogruppo (*Pvull 222-203-S-1*), com perfil de similaridade de 90%, 89% e 90% (figura 6a).




DuPont ID Label	Sample Comment	DuPont ID Similarity	RiboGroup	RiboPrint™ Pattern				
				1 kbp	5	10	15	50
{Salmonella ser. Enteritidis}	Confirmação da Identificação	{0.90}	PVUll 222-203-S-1					
{Salmonella ser. Enteritidis}	Verificação	{0.89}	PVUll 222-203-S-1					
{Salmonella ser. Enteritidis}	Verificação	{0.90}	PVUll 222-203-S-1					

Figura 6a. Tipificação das cepas de *Salmonella* Enteritidis utilizadas no experimento por meio do Riboprinter®.

As cepas de *S. Typhimurium* também foram tipificadas por meio do Riboprinter®. As três estirpes isoladas de origem avícola foram caracterizadas e demonstraram perfis de similaridade de 90%, 92% e 90%, sendo pertencentes aos ribogrupos *Pvull* 222-203-S-3 e *Pvull* 222-203-S-7 (figura 6b).

DuPont ID Label	DuPont ID Similarity	RiboGroup	RiboPrint™ Pattern				
			1 kbp	5	10	15	50
{ <i>Salmonella</i> ser. <i>Typhimurium</i> }	{0.90}	PVULL 222-203-S-3					
<i>Salmonella</i> ser. <i>Typhimurium</i>	0.92	PVULL 222-219-S-7					
<i>Salmonella</i> ser. <i>Typhimurium</i>	0.90	PVULL 222-219-S-7					

Figura 6b. Tipificação das cepas de *Salmonella* *Typhimurium* utilizadas no experimento por meio do Riboprinter®.

A ribotipagem usa o padrão de restrição do operon do RNA ribossômico (*rrn*), que são regiões consideradas “conservadas” do DNA bacteriano. Esta ferramenta epidemiológica fornece resultados para a detecção de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs). A técnica consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, digestão deste material com uma enzima de restrição, corrida eletroforética, transferência de fragmentos desnaturados para um filtro, hibridação com a sonda marcada e revelação do padrão de bandas (DARINI et al., 1998).

A ribotipagem automatizada com o uso do Riboprinter® é capaz de identificar gênero, espécie e sorovar quando a similaridade do perfil de restrição obtido é igual ou superior a 87% com os perfis existentes na livreria/biblioteca do aparelho.

4.2 Estabelecimento do inóculo experimental

Para estabelecer o inóculo experimental das fases seguintes do experimento, foram testadas as diluições 10^{-8} , equivalente a um número médio de 12 células de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, e 10^{-7} , equivalente a uma média de 126 células.

Na fortificação com a diluição 10^{-8} foi observada baixa capacidade de recuperação da bactéria, demonstrando que o método tradicional de referência não forneceu resultados consistentes com este número de células (tabela 2).

Tabela 2. Recuperação de células de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* pelo método tradicional de referência após inoculação em séries de dez tubos.

Diluição	Número médio de células (UFC)	Repetição n=10	Positivas	Negativas	Recuperação N (%)
10^{-8}	12	1	2	8	2/10 (20%)
		2	3	7	3/10 (30%)
		3	6	4	6/10 (60%)
		4	3	7	3/10 (30%)
10^{-7}	126	5	9	1	9/10 (90%)
		6	1	9	1/10 (10%)
		7	5	5	5/10 (50%)
		8	10	0	10/10 (100%)

n= número de tubos inoculados. N= número de tubos positivos em relação ao número de inoculados; UFC= unidades formadoras de colônias.

Dos quatro testes realizados com o inóculo diluído até 10^{-7} , em três deles, a recuperação da bactéria foi maior ou igual a cinco em um total de 10 repetições (tabela 2). Assim, ficou estabelecido que o inóculo experimental (fortificação) para os testes posteriores seria a diluição 10^{-7} , equivalente a número médio de 126 células de *Salmonella*.

Estudo realizado por FRODER (2008) estabeleceu o limite de detecção de *Salmonella* em fezes suínas fortificadas no método tradicional de análise em 100 UFC/g. Para a fortificação, o autor utilizou cepa de *Salmonella* Typhimurium. O número de células necessárias para fornecer resultados positivos pelo método tradicional de referência neste estudo foi semelhante ao determinado por aquele autor (aproximadamente 126 UFC/g).

Duas situações podem explicar o alto número de células de *Salmonella* necessário para obtenção de resultados positivos nos dois estudos: 1) o grande número de contaminantes competidores na matriz e, 2) a dificuldade na distribuição do inóculo na matriz estudada, que em nosso estudo, fica evidente quando se compara os resultados obtidos nas diferentes repetições. Em uma das repetições (número 6 – tabela 2), das dez amostras, somente uma foi positiva, porém, em condições semelhantes, na repetição de número 8 (tabela 2), houve 100% de recuperação. A homogeneidade da amostra é um problema citado por outros autores em situações em que é necessária a fortificação de amostras (EURACHEM, 2002).

4.3 Número de células inoculadas em cada fortificação

O número de células inoculadas em cada uma das repetições (etapas) do experimento está demonstrado na tabela 3. Este número foi determinado por meio da inoculação da diluição selecionada (10^{-7}) em sete placas de PCA (BIOAMÉRICA®). A média geral de células inoculadas nas 12 repetições (etapas) foi de 126 UFC, sendo de 127 UFC para *Salmonella* Typhimurium e 130 UFC para *Salmonella* Enteritidis. Não foi observada diferença nas contagens dos dois sorovares.

SANTOS et al. (2001) desenvolveram um protocolo de PCR para detectar *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* em amostras de carne de frango. Quando foi padronizado o inóculo experimental também selecionou para fortificação a diluição 10^{-7} , que correspondia a contagens em meio PCA de 120 UFC e 200 UFC respectivamente, para os sorovares Enteritidis e Typhimurium. O número de células obtido no inóculo utilizado pelo autor concorda com os números médios encontrados neste estudo.

Tabela 3. Número de células de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* utilizadas para fortificação das amostras em cada uma das etapas do experimento (repetições).

MATRIZ E SOROVAR	ETAPA	CONTAGEM DE COLÔNIAS NAS PLACAS (UFC)	MÉDIA E DESVIO PADRÃO (UFC)	LOG ¹⁰ (UFC)
Propé+ST	1	127; 187; 192; 50; 224; 104; 191	154±62	2,29
	2	137; 43; 175; 169; 157; 159; 146	141±46	2,14
	3	110; 85; 126; 79; 105; 119; 102	104±17	2,05
Propé+SE	4	129; 103; 138; 175; 152; 156; 177	148±27	2,12
	5	149; 120; 178; 153; 112; 133; 155	143±23	2,18
	6	147; 152; 140; 155; 125; 143; 151	145±10	2,17
Fezes+SE	7	110; 125; 133; 112; 140; 103; 93	117±17	2,05
	8	115; 89; 102; 113; 85; 91; 153	107±23	2,01
	9	149; 114; 134; 98; 107; 134; 112	122±19	2,06
Fezes+ST	10	112; 123; 115; 105; 83; 110	106±14	2,09
	11	125; 119; 95; 89; 113; 141; 124	116±18	2,08
	12	153; 148; 139; 112; 120; 173; 111	137±24	2,18
CONTAGEM MÉDIA			126±23	2,15

SE= *Salmonella* Enteritidis; ST= *Salmonella* Typhimurium.

4.4 Equivalência entre os métodos tradicional, MSR_V e Sistema BAX® para determinação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em amostras ambientais

Vários métodos podem ser utilizados para a coleta de amostras ambientais destinadas à avaliação microbiológica. O uso do propé é considerado um método eficaz para a coleta de amostras onde se deseja verificar a presença de *Salmonella* (KINGSTON, 1981; BYRD et al., 1997), e é recomendada para determinar se está havendo excreção intestinal do microrganismo pelas aves no ambiente. Os resultados obtidos podem indicar também, se um lote é positivo e se há possibilidade de transmissão horizontal (RODRIGUES, 2003). Outra possibilidade de avaliar a presença e probabilidade de disseminação de *Salmonella* no ambiente ou lotes de aves é a detecção do microrganismo diretamente nas fezes.

Os resultados individuais obtidos nos três métodos de análise para determinar a presença de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em amostras de propé e fezes podem ser observados nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4. Resultados obtidos em amostras de propé fortificadas com *Salmonella* Enteritidis (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSR.V.

ETAPA 1						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	-	+	+	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	+	-
6	+	+	+	-	-	-
7	-	-	+	-	-	-
ETAPA 2						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
ETAPA 3						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	-	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; BAX= Sistema BAX®; MT= método tradicional de referência (BRASIL, 1995); MSR.V= Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM).

Tabela 5. Resultados obtidos em amostras de propé fortificadas com *Salmonella* Typhimurium (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSR.V.

ETAPA 4						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
ETAPA 5						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	-	+	+	-	+	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-
ETAPA 6						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; BAX= Sistema BAX®; MT= método tradicional de referência (BRASIL, 1995); MSR.V= Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM).

Entre as amostras de propé, com exceção da etapa 6, em pelo menos uma das repetições foi observado um resultado negativo entre as amostras fortificadas.

Três amostras, duas analisadas pelo método tradicional e uma pelo Sistema BAX®, apresentaram resultados positivos em amostras não fortificadas. Estes resultados estão demonstrados nas tabelas 4 e 5, e são correspondentes às amostras 5 (etapa 1), 2 (etapa 5) e 2 (etapa 6). Estas cepas foram isoladas com o emprego do método tradicional de cultivo e ribotipadas através do Riboprinter®.

A cepa recuperada da amostra 5 (etapa 1 – tabela 4) com resultado positivo pelo método tradicional apresentou perfil idêntico (homologia de 90%) às cepas de

Salmonella Typhimurium utilizadas no estudo. A amostra 2 (etapa 5 – tabela 5) que apresentou resultado positivo pelo método tradicional mostrou perfil idêntico (homologia de 89%) às das cepas de *S. Enteritidis* utilizadas na fortificação. A amostra 2 (etapa 6 – tabela 5), que apresentou resultado positivo pelo Sistema BAX® também mostrou perfil idêntico (homologia de 90%) à cepa de *S. Typhimurium* utilizada no estudo. Estas análises demonstraram que os resultados positivos em amostras sabidamente negativas (não fortificadas) eram consequência de contaminação cruzada acidental.

Tabela 6. Resultados obtidos em amostras de fezes fortificadas com *Salmonella* Enteritidis (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSR.V.

ETAPA 7						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
ETAPA 8						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
ETAPA 9						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; BAX= Sistema BAX®; MT= método tradicional de referência (BRASIL, 1995); MSR.V= Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM).

Tabela 7. Resultados obtidos nas amostras de fezes fortificadas com *Salmonella* Typhimurium (teste) e sem fortificação (controle), nas diferentes repetições em três etapas utilizando os métodos de análise BAX®, tradicional e MSR.V.

ETAPA 10						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-

ETAPA 11						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	-	+	+	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	-	+	-	-	-

ETAPA 12						
Repetição	Amostras fortificadas			Amostras sem fortificação		
	BAX	MT	MSRV	BAX	MT	MSRV
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; BAX= Sistema BAX®; MT= método tradicional de referência (BRASIL, 1995); MSR.V= Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM).

4.4.1 Repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade de um método diagnóstico indica a concordância ou conformidade entre os resultados de repetições de análises ocorridas no mesmo momento ou em pequeno espaço de tempo. Demonstra a probabilidade, em porcentagem de se encontrar o mesmo resultado em duas porções ou mais da amostra analisada sob as mesmas condições (ALTMAN; BLAND, 1994).

A reprodutibilidade é a capacidade de um método diagnóstico em fornecer resultados correspondentes em uma mesma amostra, porém, em intervalo de tempo maior, como o que acontece em etapas diferentes (ALTMAN; BLAND, 1994).

A conformidade e a concordância entre os três métodos utilizados para determinação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em fezes e propé estão demonstrados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Repetibilidade e Reprodutibilidade calculados para resultados obtidos em matriz propé inoculada e não inoculada com *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* analisadas pelos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV.

Inóculo	Métodos	Amostras fortificadas		Controle negativo	
		Repe (%)	Repro (%)	Repe (%)	Repro (%)
ST	MT	95	90	95	90
	BAX	90	81	95	90
	MSRV	100	100	100	100
SE	MT	95	90	95	90
	BAX	76	52	100	100
	MSRV	95	90	100	100

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência (BRASIL, 1995); BAX=Sistema BAX®; MSRV= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM); Repe= Repetibilidade; Repro= Reprodutibilidade.

A menor concordância (repetibilidade) e correspondência (reprodutibilidade) apresentadas pelo método Sistema BAX® para análise de propé fortificada com *S. Enteritidis* pode ser consequência da distribuição não homogênea do inóculo na matriz. De acordo com a EURACHEM (2002), em ensaios microbiológicos, a distribuição de um microrganismo dentro da matriz não é responsabilidade do analista, e pode ser específica para uma amostra individual analisada.

É provável que a distribuição não homogênea dos microrganismos inoculados tenha influenciado mais os resultados do Sistema BAX® quando comparado aos outros métodos testados. Esta particularidade pode ser devida à alíquota utilizada para análise neste método ser de apenas 5µL, consideravelmente menor que as recomendadas para os outros métodos. Quando a distribuição não é homogênea, o uso de alíquotas maiores pode aumentar as chances de detecção. Porém, não é possível inferir se esta influência também acontece em amostras naturalmente contaminadas.

Tabela 9. Repetibilidade e Reprodutibilidade calculados para resultados obtidos em matriz fezes inoculada e não inoculada com *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* analisadas pelos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSR.V.

Inóculo	Métodos	Amostras fortificadas		Controle negativo	
		Repe (%)	Repro (%)	Repe (%)	Repro (%)
ST	MT	95	90	100	100
	BAX	90	81	100	100
	MSRV	95	90	100	100
SE	MT	86	71	100	100
	BAX	90	81	100	100
	MSRV	90	81	100	100

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência (BRASIL, 1995); BAX=Sistema BAX®; MSR.V= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM); Repe= Repetibilidade; Repro= Reprodutibilidade.

A reprodutibilidade deve ser avaliada em qualquer ensaio que será utilizado em muitos laboratórios, e indica a capacidade de um método proporcionar resultados consistentes quando são analisadas alíquotas de uma mesma amostra em laboratórios diferentes.

4.4.2 Sensibilidade, especificidade e acurácia

A tabela 10 demonstra a sensibilidade de cada um dos métodos testados para o diagnóstico dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em amostras ambientais.

Tabela 10. Sensibilidade dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV para o diagnóstico de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* em amostras de propé e fezes.

Matriz	Sorovar	Método	\hat{p}	Sensibilidade IC (95%)	
				LI	LS
Propé	ST	MT	0,95	0,86	1,00
		BAX	0,90	0,78	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00
	SE	MT	0,95	0,86	1,00
		BAX	0,81	0,64	0,98
		MSRV	1,00	0,84	1,00
Fezes	ST	MT	0,95	0,86	1,00
		BAX	0,90	0,78	1,00
		MSRV	0,95	0,86	1,00
	SE	MT	0,86	0,71	1,00
		BAX	0,90	0,78	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência (BRASIL, 1995); BAX=Sistema BAX®; MSRV= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM); \hat{p} = porcentagem; IC (95%)=Intervalo de confiança de 95% de probabilidade; LI= limite inferior do IC; LS= limite superior do IC.

A sensibilidade de um método diagnóstico é a proporção de positivos verdadeiros detectados por este método, ou seja, a proporção de amostras que contenham o microrganismo alvo e que fornecem resultado positivo no método em questão. Assim, testes sensíveis terão baixo número de resultados falso-negativos (OIE, 2011).

A sensibilidade dos métodos para ambos os sorovares e matrizes analisadas foi maior que 80% e em 10/12 resultados maior ou igual a 90%. Nas duas ocasiões em que foram obtidos índices menores que 90% de sensibilidade, o sorovar envolvido foi *S. Enteritidis*.

Não foi possível estabelecer relação entre a maior dificuldade de recuperação de *S. Enteritidis* em alguns testes e o número de células inoculadas (tabela 10). Porém, pode-se observar que considerando as duas matrizes, entre as amostras sabidamente positivas, (126), *S. Enteritidis* foi recuperada em 114 ocasiões (90,5%) e *S. Typhimurium* em 118 (93,7%). É provável que *S. Enteritidis* seja mais influenciada pela competição com a microbiota contaminante presentes na matriz, do que *S. Typhimurium*.

A especificidade e a acurácia determinadas para cada um dos métodos testados para o diagnóstico dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em amostras ambientais podem ser observadas nas tabelas 11 e 12.

A especificidade de um método é determinada pela proporção de resultados negativos verdadeiros detectados por este. Neste estudo específico é a proporção de amostras que não possuem *Salmonella* e que tem o resultado do teste diagnóstico negativo. Um teste específico oferece pouco risco de fornecer resultados falsos positivos (ALBANO, 2009).

Todos os testes demonstraram boa especificidade (95% a 100%), e só não alcançaram 100% de especificidade em todas as situações analisadas devido à contaminação cruzada acidental observada em três amostras de propé. Em todas estas ocasiões, as cepas foram recuperadas e tipificadas, demonstrando que se tratavam das mesmas utilizadas para a fortificação das amostras.

A contaminação acidental destas três amostras está provavelmente mais relacionada ao excesso de manipulação das amostras do que a dificuldades na execução dos métodos, que propiciam a contaminação cruzada. Neste estudo, para se obter resultados mais fidedignos, uma mesma amostra de propé em água peptonada era dividida em alíquotas para depois serem fortificadas individualmente (item 3.2). Porém, quando a análise é realizada em um ensaio de rotina, o propé é imerso na água peptonada e incubado, sem manipulação para distribuição da amostra e fortificação, como aconteceu neste estudo.

Tabela 11. Especificidade dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRV para o diagnóstico de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* em amostras de propé e fezes.

Matriz	Sorovar	Método	\hat{p}	Especificidade IC (95%)	
				LI	LS
Propé	ST	MT	0,95	0,86	1,00
		BAX	0,95	0,86	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00
	SE	MT	0,95	0,86	1,00
		BAX	1,00	0,84	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00
Fezes	ST	MT	1,00	0,84	1,00
		BAX	1,00	0,84	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00
	SE	MT	1,00	0,84	1,00
		BAX	1,00	0,84	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência; BAX=Sistema BAX®; MSRV= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado; \hat{p} = porcentagem; IC (95%)=Intervalo de confiança de 95% de probabilidade; LI= limite inferior do IC; LS= limite superior do IC.

A acurácia é uma medida capaz de indicar a qualidade dos resultados oferecidos por um método em questão. É a proporção de todos os resultados corretos do teste, tanto os positivos quanto negativos (ALTMAN; BLAND, 1994).

Tabela 12. Acurácia dos métodos tradicional, Sistema BAX® e MSRVR através de pesquisa de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* em amostras de propé e fezes.

Matriz	Sorovar	Método	p^{\wedge}	Acurácia IC (95%)	
				LI	LS
Propé	ST	MT	0,95	0,89	1,00
		BAX	0,93	0,85	1,00
		MSRV	1,00	0,92	1,00
	SE	MT	0,95	0,89	1,00
		BAX	0,90	0,82	0,99
		MSRV	1,00	0,92	1,00
Fezes	ST	MT	0,98	0,93	1,00
		BAX	0,95	0,89	1,00
		MSRV	0,98	0,93	1,00
	SE	MT	0,93	0,85	1,00
		BAX	0,95	0,89	1,00
		MSRV	1,00	0,92	1,00

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência; BAX=Sistema BAX®; MSRVR= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado; p^{\wedge} = porcentagem; IC (95%)=Intervalo de confiança de 95% de probabilidade; LI= limite inferior do IC; LS= limite superior do IC.

A acurácia determinada para os resultados obtidos por todos os métodos foi considerada adequada, com índices que variaram de 90% a 100%. O cálculo deste índice leva em consideração todos os resultados obtidos nas amostras teste (fortificadas) e controle (não fortificadas).

4.4.3 Sensibilidade, especificidade e acurácia relativas

Segundo a ISO 16041(2003), o termo “relativo” é utilizado para indicar que o valor de referência é o obtido pelo método considerado como “padrão ouro”, que neste estudo é o método tradicional (Portaria 126 – MAPA). A acurácia relativa é determinada pelo grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método tradicional e a resposta obtida pelos métodos alternativos (Sistema BAX® e MSRVR), sob amostras idênticas, nas mesmas condições.

A sensibilidade relativa é a habilidade do método alternativo em detectar o microrganismo alvo na amostra quando este for detectada pelo método tradicional e a especificidade relativa é a habilidade do método alternativo em não detectar o microrganismo alvo na amostra quando este não for detectada pelo método tradicional.

As tabelas 13 e 14 demonstram a sensibilidade, especificidade e acurácia relativas de cada um dos métodos testados para o diagnóstico dos sorovares Enteritidis e Typhimurium em amostras de fezes e propé.

Tabela 13. Acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos alternativos Sistema BAX® e MSRVR em relação ao método tradicional de referência, comparadas pela análise de fezes fortificadas com *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

CONTROLE POSITIVO								
Matriz	Inóculo	Método	p^{\wedge}	Acurácia relativa		p^{\wedge}	Sensibilidade relativa	
				IC (95%)			IC (95%)	
				LI	LS		LI	LS
Fezes	ST	BAX	0,86	0,71	1,00	0,90	0,77	1,00
		MSRV	0,90	0,78	1,00	0,95	0,85	1,00
	SE	BAX	0,86	0,71	1,00	0,90	0,77	1,00
		MSRV	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00
CONTROLE NEGATIVO								
Matriz	Inóculo	Método	p^{\wedge}	Acurácia relativa		p^{\wedge}	Especificidade relativa	
				IC (95%)			IC (95%)	
				LI	LS		LI	LS
Fezes	ST	BAX	1,00	0,84	1,00	1,00	0,84	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00	1,00	0,84	1,00
	SE	BAX	1,00	0,84	1,00	1,00	0,84	1,00
		MSRV	1,00	0,84	1,00	1,00	0,84	1,00

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência (BRASIL, 1995); BAX= Sistema BAX®; MSRVR= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM); p^{\wedge} = porcentagem; IC (95%)=Intervalo de confiança de 95% de probabilidade; LI= limite inferior do IC; LS= limite superior do IC.

A análise das amostras de fezes mostraram que a acurácia relativa do Sistema BAX® variou entre 86% e 100% e do MSRVR 90% e 100%. A sensibilidade relativa do Sistema BAX® variou entre 90% e 100% e do MSRVR, 95% e 100%. Isso demonstrou que os métodos alternativos, para pesquisa de fezes, foram correspondentes com o método tradicional de referência.

A tabela 14 demonstra a acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa das amostras de propé.

Tabela 14. Acurácia relativa, sensibilidade relativa e especificidade relativa dos métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV em relação ao método tradicional de referência, comparadas por meio de propé fortificado com *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

CONTROLE POSITIVO								
Método	ST	p [^]	Acurácia relativa		p [^]	Sensibilidade relativa		
			IC (95%)			IC (95%)		
			LI	LS		LI	LS	
Propé	BAX	0,86	0,71	1,00	0,90	0,77	1,00	
	MSRV	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00	
	BAX	0,73	0,45	0,92	0,71	0,42	0,92	
	MSRV	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00	
CONTROLE NEGATIVO								
Método	ST	p [^]	Acurácia relativa		p [^]	Especificidade relativa		
			IC (95%)			IC (95%)		
			LI	LS		LI	LS	
Propé	BAX	0,90	0,78	1,00	0,95	0,85	1,00	
	MSRV	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00	
	BAX	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00	
	MSRV	0,95	0,86	1,00	1,00	0,83	1,00	

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; MT= Método tradicional de referência (BRASIL, 1995); BAX=Sistema BAX®; MSRV= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6578:2002/DAM); p[^]= porcentagem; IC (95%)=Intervalo de confiança de 95% de probabilidade; LI= limite inferior do IC; LS= limite superior do IC.

As amostras de propé, depois de analisadas, mostraram pelo Sistema BAX® acurácia relativa entre 73% e 95%. O MSRV apresentou acurácia relativa de 95% em relação ao método tradicional, para amostras fortificadas com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A sensibilidade relativa do Sistema BAX® foi de 90% para *S. Typhimurium* e 71% para *S. Enteritidis*, e do MSRV foi de 100% para os dois sorovares. A análise das amostras sem fortificação mostrou especificidade relativa de 100%, com exceção do Sistema BAX® fortificado com *S. Typhimurium*, que foi de 95%.

Em estudo realizado por FRANCHIN et al. (2006), foi feita uma comparação do Sistema BAX® e MSRV através da detecção de *Salmonella* em carcaças de frangos e suínos. Nos dois tipos de amostras, não houve diferença significativa entre os métodos de detecção. Carcaças de frango e amostras de carne suína mostraram especificidade semelhante em ambos os métodos. Amostras de carcaças de frango tiveram sensibilidade maior no MSRV do que no Sistema BAX® e amostras de carne

suína mostrou sensibilidade semelhante em ambos métodos. A concordância entre os métodos para os dois tipos de amostras foi de 95%.

Neste estudo também foi observado índices semelhantes de sensibilidade e especificidade relativas, indicando concordância entre as metodologias para os dois tipos de matrizes analisados. Em se tratando de fezes, pode-se dizer que os índices relativos foram um pouco menores, provavelmente, devido à natureza da matriz, ao alto índice de contaminantes presentes, presença de muco, homogeneidade do inóculo e outros fatores.

O monitoramento ambiental para verificar a presença de *Salmonella* utilizando por meio de amostras de fezes ou colhidas por propé é prático, de simples manuseio e eficiente no monitoramento de lotes avícolas comerciais. No caso de frangos de corte, esse monitoramento é extremamente importante para verificar se os lotes que irão para o abate estão livres de *Salmonella*. Para atender o Regulamento da Comissão Europeia (CE) (n.º 646/2007), onde as aves devem ser analisadas antes do abate, o propé é uma forma bastante eficaz e, em caso de lotes positivos, pode ser feito um remanejamento do abate para não haver contaminação do produto final. A partir da crescente ênfase na redução da contaminação de produtos cárneos após o processamento, tem-se estimulado a identificação de medidas para reduzir ou eliminar esse microrganismo antes do abate (FUNK et al., 2001), uma vez que a redução das taxas de infecção pré-abate resulta em aumento da segurança dos produtos (HURD et al., 2002).

4.5 Teste de conformidade entre resultados fornecidos pelo método de referência e os métodos alternativos Sistema BAX® e MSR-V para avaliação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em amostras ambientais

A tabela 15 demonstra a sensibilidade de cada um dos métodos testados para o diagnóstico dos sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* em amostras ambientais.

Tabela 15. Teste de conformidade para os métodos alternativos (Sistema BAX® e MSRV) em relação ao método tradicional de referência, para as matrizes de fezes e propé fortificadas com *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis*.

Controle positivo					
Matriz	Método	Inóculo	Xo=	Para n=21	Decisão
Fezes	BAX	ST	3	<7	Conforme
		SE	3	<7	Conforme
	MSRV	ST	2	<7	Conforme
		SE	4	<7	Conforme
Propé	BAX	ST	3	<7	Conforme
		SE	4	<7	Conforme
	MSRV	ST	2	<7	Conforme
		SE	1	<7	Conforme
Controle negativo					
Matriz	Método	Inóculo	Xo=	Para n=21	Decisão
Fezes	BAX	ST	0	<7	Conforme
		SE	0	<7	Conforme
	MSRV	ST	0	<7	Conforme
		SE	0	<7	Conforme
Propé	BAX	ST	2	<7	Conforme
		SE	1	<7	Conforme
	MSRV	ST	0	<7	Conforme
		SE	0	<7	Conforme

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; BAX=Sistema BAX®; MSRV= Meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (ISO 6579:2002/DAM); Xo= número de resultados não conformes; n= tamanho da amostra.

A análise individual dos resultados obtidos no método de referência para as amostras fortificadas e controles em relação aos resultados obtidos para as mesmas amostras nos métodos alternativos (MT x BAX; MT x MSRV) permitiu concluir que os mesmos possuem desempenhos semelhantes.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os métodos alternativos testados para a análise de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em amostras ambientais foram considerados conformes (tabela 15).

Apesar disso, alguns ensaios mostraram resultados individuais que não eram os esperados (resultados negativos em amostras fortificadas). Porém, deve-se levar em consideração que discrepâncias podem ocorrer em ensaios biológicos que envolvem inoculação experimental, onde fatores como a distribuição do inóculo nas matrizes podem interferir nos resultados.

Estudos colaborativos foram realizados em diversos laboratórios na Europa para comparar o desempenho de métodos para isolamento e detecção de

Salmonella em fezes (VOOGT et al., 2002). Para os laboratórios participantes foram fornecidas amostras iguais, e os resultados revelaram discordância entre os diagnósticos obtidos em diferentes métodos de detecção. Muitos métodos usados no estudo foram modificados, e novos métodos foram desenvolvidos para o isolamento de *Salmonella* em amostras fecais. Teoricamente, os métodos oferecem resultados precisos e reprodutíveis, mas na realidade dos ensaios laboratoriais, variabilidades consideráveis podem ocorrer (WALTMAN e MALLINSON, 1995; VOOGT et al., 2002).

4.6 Limite de detecção do Sistema BAX®

O limite de detecção do método molecular Sistema BAX® foi realizado separadamente para os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Os resultados obtidos de amostras sem a presença de matriz em diferentes níveis de fortificação pode ser observado na tabela 16.

O menor número de células inoculadas foi correspondente a uma diluição seriada do inóculo até 10^{-9} , correspondente, de acordo com as contagens, a uma média de 5 UFC de *Salmonella*. Neste nível de fortificação, duas amostras apresentaram resultados negativos para os dois sorotipos, sendo a diluição 10^{-9} desconsiderada. Estes resultados demonstraram que a diluição que seria detectada pelo Sistema BAX® era a 10^{-8} , equivalente a um valor médio de 25 células de *Salmonella*.

Tabela 16. Resultados das análises de amostras inoculadas com *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, em diferentes níveis de fortificação (diluição 10^{-5} a 10^{-9}), realizadas em triplicata através do Sistema BAX®.

Inóculo	Diluição				
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
<i>S. Enteritidis</i>	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
<i>S. Typhimurium</i>	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)
	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)

Estudo realizado por BENNETT et al., (1998) mostrou que o Sistema BAX® apresentou resultados positivos quando a concentração de células de *Salmonella* após o enriquecimento não seletivo em água peptonada foi de 5×10^3 UFC/mL ou maior. Não é possível comparar estes resultados ao destes autores, já que o número de células após o enriquecimento não foi realizado.

Depois de definido o limite de detecção sem presença de matriz, determinações foram realizadas com as menores diluições das cepas que apresentaram resultados adequados (10^{-8} e 10^{-7}), porém, na presença de matriz. As contagens em ágar PCA (BIOAMERICA®) foram feitas, em cada repetição, para determinar a quantidade de células de *Salmonella* que foi inoculada nas matrizes. As médias das contagens (UFC) e os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 17.

Tabela 17. Taxa de recuperação de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, analisadas a partir de propé e fezes, em dois níveis de fortificação (diluições 10^{-8} e 10^{-7}), através do Sistema BAX®.

Diluição UFC	Média das contagens (UFC)	Matriz	Inóculo	N=21		Recuperação (N%)
				Positivos	Negativos	
10^{-8}	25	Propé	ST	21	0	21/21 (100%)
			SE	15	6	15/21 (71%)
		Fezes	ST	10	11	10/21 (47%)
			SE	5	16	5/21 (23%)
10^{-7}	122	Propé	ST	21	0	21/21 (100%)
			SE	20	1	20/21 (95%)
		Fezes	ST	21	0	21/21 (100%)
			SE	19	2	19/21 (90%)

ST= *Salmonella* Typhimurium; SE= *Salmonella* Enteritidis; n= número de amostras inoculadas; N= número de positivas em relação ao número total de amostras inoculadas; UFC= unidades formadoras de colônias.

Foi considerado como limite de detecção, o número de células capaz de gerar, no mínimo, 19 resultados positivos entre os 21 inoculados (90%) (OIE, 2011). A recuperação de amostras através da diluição 10^{-8} , equivalente a uma média de 25 UFC de *Salmonella*, demonstrou resultados incapazes de definir o limite de detecção do Sistema BAX®. Sendo assim, os testes foram realizados com a diluição 10^{-7} , equivalente a uma média de 122 UFC de *Salmonella*. As análises mostraram capacidade de recuperação da bactéria pelo método entre 90% e 100%, podendo

definir que o limite de detecção do Sistema BAX® foi equivalente à diluição 10^{-7} (contagem média de 122 UFC de *Salmonella*). Através desses dados foi possível determinar que o limite de detecção do Sistema BAX® foi o mesmo verificado no estabelecimento do inóculo experimental (item 4.2).

4.7 Considerações

Durante a realização do estudo, foi possível perceber vantagens e desvantagens em cada um dos métodos utilizados. A metodologia oficial, apesar da precisão do diagnóstico, é bastante trabalhosa e requer vários dias para ser concluída. Os métodos alternativos Sistema BAX® e MSRV apresentaram maior simplicidade na execução das análises e menor tempo de indicação dos resultados.

O Sistema BAX® é um método automatizado e simplificado, que possui aprovações em todo o mundo para vários tipos de matrizes, que representa uma metodologia confiável para detecção de *Salmonella*, já consolidada na área de alimentos. Possui como vantagem a padronização das etapas e reagentes e a não necessidade de interpretações subjetivas, já que os dados são previamente interpretados pelo software do equipamento que fornece os resultados como positivos e negativos na tela do aparelho. A padronização é uma característica que deve ser levada em consideração quando há necessidade de analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo. Deve-se destacar também a redução considerável no tempo necessário para a obtenção dos resultados.

O protocolo utilizado para a análise da matriz fezes no Sistema BAX®, foi o utilizado pelo NPIP, que recomenda o uso de enriquecimento não seletivo e seletivo, aumentando o tempo de diagnóstico em 24 horas em relação às amostras de propé.

O uso do MSRV se mostrou um método prático e eficiente para determinação de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em amostras ambientais. Além disso, também diminui consideravelmente o tempo necessário para obtenção dos resultados para 48 horas em amostras negativas. Há necessidade de confirmação dos positivos, assim como no Sistema BAX®.

Apesar da qualidade dos resultados obtidos com este método duas particularidades devem ser levadas em consideração quando se adota este método

como diagnóstico: 1) há necessidade de treinamento do operador por pessoa habilitada para o preparo do meio e para a interpretação correta do resultado e deve-se reforçar ao usuário que o resultado não deve ser liberado antes das 48 horas de incubação, e 2) este método não detecta os sorovares imóveis *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que fazem parte do PNSA (Plano Nacional de Sanidade Avícola). Apesar de amostras ambientais não serem as mais indicadas para o monitoramento destes sorovares, caso presentes, sua detecção precoce no ambiente é desejável e contribui na biossegurança.

Apesar de vários destes métodos serem considerados rápidos, a maioria dos sistemas de detecção de *Salmonella* ainda recorre aos métodos culturais convencionais para ampliar a população da bactéria em caldo de cultura. Desta forma, pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo ou procedimentos pós-enriquecimento, ou alguma combinação destes, pode ser usada em conjunto com métodos rápidos (FIOCRUZ, 2008). Tanto para o uso do Sistema BAX® quanto para o MSRV as amostras devem ser pré-enriquecidas antes da análise propriamente dita.

Pela importância da *Salmonella* na saúde pública, o monitoramento deste microrganismo é fundamental e deve ser realizado rotineiramente. Com a exigência para exportações da avaliação de lotes pré-abate é desejável que outros métodos além do tradicional de referência sejam avaliados e, se equivalentes, sejam incorporados à rotina, principalmente se o diagnóstico for mais prático e apresentar resultados mais rápidos. Além disso, a implementação de metodologias mais práticas e que demandam menos tempo é uma vantagem em se tratando da rotina intensa da indústria avícola.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que, para as matrizes analisadas (propé e fezes) os métodos alternativos Sistema BAX® e Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV) (ISO 6579) são equivalentes ao método oficial brasileiro (Portaria 126 – MAPA).

O limite de detecção do Sistema BAX® para as matrizes ambientais fezes e propé foi equivalente a diluição 10^{-7} (média de 122 células de *Salmonella* spp.), semelhante ao do método tradicional de referência.

6 REFERÊNCIAS

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T. **Validação e garantia de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009, 136 p.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. **British Medical Journal**, Londres, v. 308, n. 6943, p. 1552, 1994.

ANDERSON, S. R.; FLATMAN, G. T.; BORGMAN, L. Environmental sampling: a brief review. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 4, n. 2, p.115-131, 1994.

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.16, n.1, p.190-194, 2009.

ANDRIGHETTO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica**. 2006, 99f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326 – SVS/MS de 30 de julho de 1997 (DOU. de 01/08/97). Aprova o Regulamento Técnico "Condições Higiênicas-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos" Portaria D.O.U – Seção I – 01.08.97.

BAIRD, R. M., CORRY, J. E. L., CURTIS, G. D. W., MOSSEL, D. A. A., SKOVGAARD, N. Pharmacopoeia of culture media - Additional monographs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 85-144, 1989.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 20, n. 2, p. 335-348, 1991.

BEAL, R.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S.; BARROW, P.; SMITH, A. Age at primary infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 100, n. 3-4, p.151-164, 2004.

BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 437-441, 1998.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; ACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.185-195.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. S. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. Seção. 4, p. 435-454.

BOLDEJIK, R. F.; MILAS, J. E. *Salmonella* detection in Dried Milk products by Motility Enrichment on Modifie Semisolid Rappaport-Vassiliadis Medium. Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n. 2, p. 441-450, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 126, de 03 de novembro de 1995. Aprova as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 de nov. 1995. Seção 1. p. 17694.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p.9.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 7 de junho de 2004. Oficializa a validação da metodologia utilizada pelo

sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp em amostras de alimentos, água e amostras ambientais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jun. 2004. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio - Mundial e Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2005.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2011/2012 a 2021/2022**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília: Mapa/ACS, 2012. 76 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, jan. 2008. 186p.

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

BRYAN, F.L.; DOYLE, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 3, p.326-344, 1995.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 117-131, 1995.

BYRD, J. A.; CORRIER, D. E.; De LOACH, J. R.; NISBET, D.J. Comparison of drag-swab environmental protocols for the isolation of *Salmonella* in poultry houses. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 41, n. 3, p. 709-713, 1997.

CARDINALE, E.; TALL, F.; GUÈYE, E. F.; CISSE, M.; SALVAT, G. Risk factors for *Salmonella* enterica subsp. enterica infection in senegalese broiler-chicken flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 63, n. 3-4, p. 151-161, 2004.

CARDOSO, A.L.S.P; TESSARI, E.N.C. Divulgação técnica: *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, 2008.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with frozen pot pies- United States, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.57, n.47, p. 1277-1280, 2007.

CHENG, C. M.; LIN, K.T.; VAN, L.; PHAN, N. N.; TRAN E. D. FARMER, Rapid detection of *Salmonella* in foods using real time PCR. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 12, p. 2436-2441, 2008.

CONNOR, B. A; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 5, n. 10, p. 623-628, 2005.

CHAU, P.Y., HUANG, C.T. A one-day selective migration procedure for detecting salmonellae in faeces. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v. 27, n. 5, p. 405-407, 1974.

CHEN, H.; FRASER, A. D. E.; YAMAZAKI, H. Evaluation os toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enriqueciment period. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 151-159, 1993.

DAVIES, R. H.; BRESLIN, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. **Journal of the British Veterinary Association**, Londres, v.152, n. 10, p. 283-287 2003.

DARINI, A. L. C.; MAGALHÃES, V. D.; CROTT, L. S. P. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.30, p.73-80, 1998.

DE SMEDT, J.; BOLDERDIJK, R.; MILAS, J. *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 365-373, 1994.

DE SMEDT, J. M. BOLDERDIJK, R. F., RAPPOLD, H., LAUTENSCHLAEGER, D., Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid

Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 7, p. 510-514, 1986.

DE VRIES, T.S. *Salmonella* control in the Netherlands – leading to reduction. **World Poultry**, Surrey, v. 19, n. 10, p. 26-28, 2003.

ERIKSSON, E.; ASPAN, A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 3, p. 21, 2007.

EURACHEM/EA Guide 04/10 – **Accreditation for Microbiological Laboratories**, 2002. (complem. ISO 17025).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, Italy, v. 223, n.1, p. 217, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **The EFSA Journal**, Italy, v.8, n. 1, p. 1496, 2010.

FERRIS, K. E.; AALSBURG, A. M.; PALMER, E. A.; HOSTETLER, M. M. *Salmonella* serotypes from animals and related sources reported during July 2002–June 2003. **In: Proceedings of the 107th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association**. U.S. Animal Health Association, Richmond, VA. p. 463–469, 2003.

FERRUS, M. A.; HERNANDEZ, M.; RODRIGO, A.; TOMAS, D. Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in Chicken Feces Samples. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 3, p. 180-189, 2009.

FORTUNA, J. L.; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 128, p. 33–44, 2005.

FRANCHIN, P. R.; OGLIARI, P. J.; ANDRADE, D. F.; CHIAPINOTO, M.; LEMOS, G.; REBELATTO, M.; SILVA, I. G.; BATISTA, C. R. V. Comparison of the BAX® SYSTEM with an in-house MSR method for the detection of *Salmonella* in chicken carcasses and pork meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 521-526, 2006.

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

FUNK, J. A.; DAVIES, P. R.; NICHOLS, M. A. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 45-60, 2001.

GAST, R. K. Detecting infections of chicken with recent *Salmonella* Pullorum isolates using standart serological methods. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 17-23, 1997.

GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid Infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12 ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 636-665, 2008.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars**. 9. ed. Paris: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. 166p.

HACCP in microbiological safety and quality, microorganisms in foods. Oxford: Blackwell Scientific, v.1, 1995.

HEYNDRICKX, M.; VANDEKERCHOVE, D.; HERMAN, L.; ROLLIER, I.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 129, n. 2, p. 253-265, 2002.

HUMPHREY, T. J.; MEAD, G. C.; ROWE, B. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.100, n. 2, p.175-184, 1988.

HURD, H. S.; MCKEAN, J. D.; GRIFFITH, R. W.; WESLEY, I. V.; ROSTAGNO, M. H. *Salmonella* enterica infections in market swine with and without transport and holding. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p.2375–2381, 2002.

ISO - International Organization for Standardization. Amended ISO 6579:2002/DAM. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 2002.

ISO - International Organization for Standardization. Amended ISO 16140 **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.** 2003.

KINGSTON, D. J. A comparison of culturing drag *swab* and litter for identification of infections with *Salmonella* spp. in commercial chicken flocks. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 25, n. 2, p. 513-516, 1981.

KORSAK, N.; DEGEYE, J. N.; ETIENNE, G.; CHINA, B.; DAUBE, G. Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 10, p. 2158-2164, 2004.

KUSSIDA, M. M. **Validação de métodos laboratoriais: Avaliação do Sistema BAX® de análise de *Salmonella* sp em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR).** Tese (Doutorado). 2005. 194 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LIBBY, S. J.; HALSEY, T. A.; ALTIER, C.; POTTER, J.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.** 3 ed. Blackwell Publishing, p. 143-167, 2008.

MACIOROWSKI, K. G.; HERRERA, P.; JONES, F. T.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in animal feeds: a review. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p.127–137, 2006.

MALORNY, B.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DE MEDICI, D.; CROCI, L.; ABDULMAWJOOD, A.; FACH, P.; KARPISKOVA, R.; AYMERICH, T.; KWAITEK, K.; HOORFAR, J.; MALORNY, B. Multicenter validation of PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* in chicken and pig samples. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 87, n. 4, p. 861- 866, 2004.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 290-296, 2003.

MALORNY, B.; HUEHN, S.; DIECKMANN, R.; KRÄMER, N.; HELMUTH, R. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 2, p. 81–95, 2009.

MARIN, C., HERNANDEZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p.424-431, 2009.

MASTROENI, P., CHABALGOITY, J. A., DUNSTAN, S. J., MASKELL, D. J., DOUGAN, G. *Salmonella*: immune responses and vaccines. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 161, n. 2, p.132–164, 2001.

MEAD, G.; LAMMERDING, A. M.; COX, N.; DOYLE, M. P.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; NASCIMENTO, V. P.; WIERUP, M., Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 8, p. 1566-1590, 2010.

MROZINSKI, P.M.; BETTS, R.P.; COATES, S. Performance tested method certification of BAX for screening *Salmonella*: a case study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 81, n. 6, p. 1147-1154, 1998.

NASCIMENTO, M.S.; BERCHIERI JR, A.; BARBOSA, M.D.; ZANCAN, F.T.; ALMEIDA, W.A.F. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 85-91, 2000.

NEGRETE, I. D. R. A. **Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004.** Tese (Doutorado). 2004. 216p. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

O'DONOGUE, D.; MORGAN, R.; PUGH, S.; DAVDA, C. Comparison of the MSRV method with various rapid and conventional *Salmonella* detection methods for chocolate, confectionery and biscuit ingredients. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 92-95, 1992.

O'DONOGHUE, D.; WINN, E. Comparison of the MSRV method with an inhouse conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 174-177, 1993.

OIE – WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2010. Salmonellosis**. Paris, 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2011.

OIE – WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.5 – Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry**. 2011. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.6.5.pdf>. Acesso em: 10 set. 2011.

OLIVEIRA, G. **Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* no processo de fabricação da farinha de vísceras, destinada à fábrica de rações para aves**. 1996. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. Canoas, RS: Ulbra 1995. 142p. Canoas, v.2, 2000.

PENHA, G. A.; SUZUKI, E. Y.; UEDA, F. S.; PEREIRA R. E. P. Diagnóstico da salmonelose e sua importância para a avicultura: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Garça, São Paulo, ano VI, n. 10, 2008.

PIRES, S.M.; VIGRE, H.; MAKELA, P.; HALD, T. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 11, n. 7, p. 1351-1361, 2010.

POINTON, A.; SEXTON M.; DOWSETT, P.; SAPUTRA, T.; KIERMEIER, A.; LORIMER, M.; HOLDS, G.; ARNOLD, G.; DAVOS, D.; COMBS, B.; FABIANSOON, S.; RAVEN, G.; MCKENZIE, H., CHAPMAN, A., SUMNER, J. A baseline survey of the microbiological quality of chicken portions and carcasses at retail in two Australian states (2005 to 2006). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 6, p. 1123–1134, 2008.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2000 (n° 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 10, p. 907- 909, 2001.

POPPE, C. **Salmonella in Domestic Animals**. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl, International, 2000.

RALL, V. L. M.; RALL, R.; ARAGONI, L. C.; SILVA, M. G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 147-150, 2005.

READ, S.C. IRWIN, R.J. POPPE, C., HARRIS, J. A comparison of two methods for the isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 1617-1621, 1994.

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, v.2, 2005, p.223-228.

RODRIGUES, L. B., NASCIMENTO, V.P.N. Levantamento sorológico e detecção de *Salmonella* sp. em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 71-72, 2003.

ROSE, N., F.; BEAUDEAU, P.; DROUIN, J. Y.; TOUX, V. R.; COLIN, P. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**. Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 9-20, 2000.

RUBIN, L. S.; ILHA, A. S. O Comércio Brasileiro de Carne de Frango no Contexto da Integração Regional, **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 199-215, 2008.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P. OLIVEIRA; S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, A. R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SAROJ, S.D.; SHASHIDHAR, R.; KARANI, M.; BANDEKAR, JR. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture- Nested PCR combination assay. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 22, n. 3, p. 201-206, 2008.

SCHWARTZ, K. J. **La salmonelosis em el cerdo**. Enfermedades entéricas, Hong Kong, Mayo, 1996, p. 18-21.

SILBERNAGEL, K.; JECHOREK, R.; CARVER, C.; BARBOUR, M.; MROZINSKI, P. Evaluation of the BAX® System for Detection of *Salmonella* in Selected Foods: Collaborative Study, **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 86, n. 6, 2003.

SILVA, E. M, DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SVS. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasil, 2008.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf> Acesso em: 15 mar. 2012.

TOMAZELLI, I. B.; FREITAS, J. B.; FABBI, L. M.; FILIPINI, T. A.; SILVA, C. M., BEDIN, J. M.; DUARTE, D. A. M.; SANTOS, A.; BACCARIN, A.; HIGA, L. R. G.; YANO, D. M. Y.; KILLNER, M.; FREZZA, A. L. C.; ABECIA, E. C. G.; TRONCO, V. M.; TOMAZELLI JR, O.; BARONI JR., W. Comparison of the BAX System PCR Method to Brazil's Official Method for the Detection of *Salmonella* in Food, Water, and Environmental Samples, **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 12, p. 2442–2447, 2008.

THOMASON, B. M.; DODD, D. J.; CHERRY, W. B. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 270-271, 1977.

USDA – United States Department Of Agriculture – Animal And Plant Health Inspection Service. 2012. **DuPont Qualicon BAX Polymerase Chain Reaction (PCR) - based assay for *Salmonella* - DuPont Qualicon, Wilmington, DE 19810**.

Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/poultry/> Acesso em: 05/03/2012.

USER'S GUIDE **BAX® System PCR assay with automated detection for bacterial screening**, Wilmington, Du Pont Qualicon, 2010.

VAN IMMERSEEL, F.; MEULEMANS, G.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; ELGE, P.; BOTTREAU, E.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Bacteria host interactions of *Salmonella* Paratyphi B dT+ in poultry. **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 239–243, 2004.

VOOGT, N., RAES, M., WANNET, W.J.B., HENKEN, A.M., VAN DE GIESSEN, A.W. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p.89-92, 2001.

WALTMAN, W. D.; HORNE, A. M.; PIRKEL, E. C. Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 37, p. 884-887, 1993.

WIERUP, M. **The Swedish *Salmonella* control program in primary production - an overview of its background, strategy and development**, p. 11–14. In Proceedings of the Med Vet Net Workshop on Salmonella Control in Poultry from Feed to Farm, Uppsala, Sweden, 13 to 17 March 2006. 2006. Disponível em: <<http://www.medvetnet.org/salmonellaworkshop>>. Acesso em: 22 ago. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response / WHO Global Salm-Surv**. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/gfn/links/GSSProgressReport2005.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2011.

APÊNDICE

Recommended Protocols for NPIP Samples

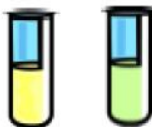
For *Salmonella* testing of environmental samples, including drag swabs, fecal samples, dust, chick pads and meconium

Pre-Enrichment Method



Add pre-warmed (37°C) BPW to environmental sample in bag (1:10 ratio). Mix well to combine.

Incubate at 37°C for 20-24 hours.



Transfer 1 mL sample to 10 mL TT-Hajna broth. Incubate at 37°C or 41.5°C* for 20-24 hours.

AND

Transfer 0.1 mL sample to 10 mL RV broth. Incubate at 42°C for 20-24 hours.

Confirmation

Samples should be confirmed according to the NPIP plating method or according to your laboratory's SOP.

Direct Enrichment Method

no
pre-enrichment
step



Add pre-warmed TT-Hajna broth to environmental sample in bag (1:10 ratio). Mix well to combine.

Incubate at 37°C or 41.5°C* for 20-24 hours.

Confirmation

Samples positive with the BAX® System should be confirmed according to the NPIP plating method or according to your laboratory's SOP.

Samples negative with the BAX® System should be confirmed with the DSE procedure described in the NPIP method or according to your laboratory's SOP.