

BRUNO MELO GASPAR

Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas através da microbiologia tradicional e método molecular

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Gaspar, Bruno Melo, 1991-
G249d Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. em carcaças
2019 de frango artificialmente e naturalmente contaminadas através da
microbiologia tradicional e método molecular / Bruno Melo
Gaspar. – Vicoso, MG, 2019.
viii, 34f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella*. 2. Bactérias - Identificação. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Mestrado em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 579.34

BRUNO MELO GASPAR

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* spp. DE CARÇAÇAS DE FRANGO ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADAS ATRAVÉS DA MICROBIOLOGIA TRADICIONAL E MÉTODO MOLECULAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

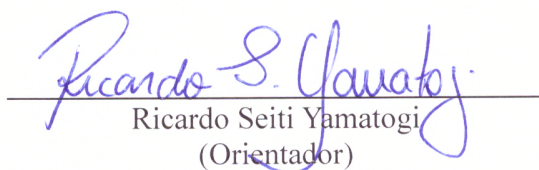
APROVADA: 23 de julho de 2019.



Luciano dos Santos Bersot



Marcus Vinicius Coutinho Cossi



Ricardo Seiti Yamatogi
(Orientador)

À minha família, amigos e colegas.

DEDICO

ii

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as adversidades.

Ao meu orientador Doutor Ricardo Seiti Yamatogi, pelo suporte, orientações, correções e incentivos.

Aos meu pais e família, por todo o apoio incondicional.

A minha namorada Thais de Oliveira, por sempre estar presente, ser paciente e companheira.

A esta universidade, seu corpo docente, aos técnicos, colegas de laboratório e a todos que de alguma forma participaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	9
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivos específicos.....	14
4. ARTIGO – Improvement of mNMP technique associated with qPCR for quantification of <i>Salmonella</i> spp. in retail poultry carcasses.....	15
ABSTRACT	18
1.INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Teste in vitro para detecção quantitativa de <i>Salmonella</i> spp.....	20
2.1.1 Preparação do inóculo	20
2.1.2 Preparação da amostra	20
2.2 Padronização do método de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) com o método rápido (mNMP+qPCR) em amostras artificialmente contaminadas.	21
2.2.1 Preparo das amostras artificialmente contaminadas.....	21
2.2.2 Técnica de Número Mais Provável Miniaturizado - mNMP	21
2.2.3 Associação das técnicas de mNMP e qPCR (método rápido).....	22
2.3 Obtenção do DNA	22
2.3.1 Identificação do agente pela qPCR.....	23
2.4 Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. em amostras naturalmente contaminadas	23
2.4.1 Coleta e preparação das amostras.....	23
2.4.2 Detecção e quantificação de <i>Salmonella</i> spp. utilizando-se as técnicas de mNMP e mNMP + qPCR.....	24
2.5 Análise estatística	24
3.RESULTADOS.....	24
5.CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo dos procedimentos aos quais as amostras foram submetidas. Fonte: O autor (2019).	22
Figura 2: Comparação das técnicas de mNMP tradicional e mNMP + qPCR para a detecção de <i>Salmonella</i> spp. em amostras artificialmente contaminadas.....	25
Figura 3: Representação das 50 amostras realizadas pela técnica de mNMP+qPCR em quatro categorias: não detectável (<0,35 NMP/g), contaminação baixa (<1,0 NMP/g), contaminação média ($\geq 1,0$ e $\leq 3,0$ NMP/g) e alta contaminação (>3 NMP/g).	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores (MALORNY et al., 2004) utilizados na reação de qPCR para a identificação do gênero <i>Salmonella</i> spp.	23
Tabela 2: Comparação da metodologia microbiológica convencional com a qPCR por meio de tabulação cruzada para a determinação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo entre as duas técnicas testadas.	25

RESUMO

GASPAR, Bruno Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas através da microbiologia tradicional e método molecular.** Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

A Salmonelose é uma enfermidade veiculada por alimentos que provoca sintomas relacionados principalmente ao trato gastrointestinal, como diarreias e vômitos, podendo também apresentar quadros de infecção sistêmica e até levar ao óbito. O microrganismo responsável pela doença é a *Salmonella* spp.. Esta doença, gera anualmente diversos surtos em vários países, assim como grandes prejuízos econômicos. Este agente é muito prevalente na indústria de produção de aves, por ser naturalmente presente no trato gastrointestinal das aves. A pesquisa, identificação e quantificação da *Salmonella* spp. é de grande interesse e importância para a indústria e consumidores afim de garantir um produto final seguro. Contudo, os métodos de detecção convencionais e atuais são laboriosos e exigem um período de 5 a 7 dias para conclusão do diagnóstico, além de fornecerem apenas dados de caráter qualitativo. Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de reduzir o tempo de detecção e fornecer resultados quantitativos utilizando uma associação das técnicas de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) e *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Após padronização da técnica constatou-se sua aplicabilidade em amostras artificialmente contaminadas, posteriormente, 50 carcaças de frango congeladas obtidas do mercado local. Estas amostras foram submetidas a técnica de microbiologia tradicional à partir da *Bacteriological Analytical Methods* (BAM) e à associação de mNMP e qPCR. Os resultados obtidos indicaram uma frequência de 38% *Salmonella* spp., quando analisados os dados de ambas as técnicas aplicadas. A microbiologia convencional foi capaz de detectar 8% de positividade, enquanto a técnica associada de mNMP e qPCR detectou 34%. O intervalo de detecção das técnicas associadas foi de aproximadamente 36 horas e a partir destas foi possível quantificar a contaminação pelo agente. A quantificação das amostras positivas foi expressa em NMP/g e variou entre 0,35 NMP/g e 59NMP/g, sendo esta quantificação, um dado alarmante, que indica um grau de contaminação importante neste tipo de produto.

ABSTRACT

GASPAR, Bruno Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Detection and quantification of *Salmonella* spp. in artificially and naturally contaminated chicken carcasses through traditional microbiology and molecular method.** Adviser: Ricardo Seiti Yamatogi.

Salmonellosis is a foodborne disease that causes symptoms related mainly to the gastrointestinal tract, such as diarrhea and vomiting, and may also present systemic infections and even lead to death. The microorganism responsible for the disease is *Salmonella* spp.. This bacterium generates several outbreaks annually in various countries, as well as major economic losses. This agent is very prevalent in the poultry industry, as it is a naturally occurring bacterium in the gastrointestinal tract of these animals. The research, identification and quantification of *Salmonella* spp. is of great interest and importance to the industry to guarantee the end consumer a safe product. Despite this, conventional detection methods are currently laborious and require a period of 5-7 days to complete providing only qualitative data. The present work was developed to reduce detection time and to produce quantitative results using a combination of Miniaturized Most Probable Number (mMPN) and Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) techniques. After standardization of the technique in samples artificially contaminated, the technique demonstrated its applicability in natural occurring *Salmonella* spp. samples. Posteriorly, 50 frozen chicken carcasses of 5 different brands were bought from retail, during the second semester of 2018 and first semester of 2019, processed and stocked. They were then subjected to the traditional microbiology technique using the Bacteriological Analytical Methods (BAM) and the association of mMPN and qPCR. The results indicated a frequency of 38% of *Salmonella* spp., when analyzing the combined data of both techniques applied. Conventional microbiology was able to detect 8% of positivity, while the associated mMPN and qPCR technique detected 34%. The detection interval of the associated techniques was approximately 36 hours and from these it was possible to quantify the contamination by the agent. Quantitation of positive samples was expressed in MPN/g and ranged from 0.35 MPN/g to 59 MPN/g, and this quantification is alarming, indicating a significant degree of contamination in this type of product.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil foi o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o maior exportador em 2017. Neste ano foram produzidas 13.056 toneladas das quais 4.320 destinaram-se à exportação. O consumo per capita deste produto no país é de cerca de 42,07 kg/ano, salientando a importância deste produto para a economia brasileira (ABPA, 2018). Os principais importadores deste produto foram: Arábia Saudita, China e Japão (IBGE, 2019), além disso projeções indicam aumento no consumo de carne de frango globalmente (OECD/FAO, 2016).

Alimentos podem estar diretamente relacionados a veiculação de doenças a humanos. A indústria de produção de carne de aves, principalmente de perus e frangos, está associada a diversos patógenos prejudiciais tanto a saúde animal, quanto humana. Um dos microrganismos que destaca-se é *Salmonella* spp.. Dependendo do sorovar, esta bactéria possui o potencial de colonizar o trato gastrointestinal de aves, sem provocar-lhes qualquer malefício.

A contaminação dos alimentos oriundo das aves está relacionada a cadeia produtiva e suas diferentes e múltiplas etapas. Desde a criação até o abate e processamento da carne, existem pontos que podem levar à contaminação pelo agente. A evisceração por exemplo, pode ser considerada um destes momentos críticos e pode acarretar no acometimento de não apenas a ave carreadora do patógeno, mas todo o lote processado posteriormente.

Esta zoonose está entre as principais doenças veiculadas por alimentos no mundo. O agente gera anualmente grandes prejuízos, tanto à saúde humana, quanto monetários e provoca a doença chamada salmonelose. Esta doença em humanos, provoca sintomas relacionados ao trato gastrointestinal tais como: vômitos e diarreia, porém possui ainda o potencial de promover infecções sistêmicas e levar ao óbito.

A relação intrínseca da carne de aves e desta bactéria, leva à necessidade da realização de testes para comprovar a inocuidade dos alimentos vendidos ao público. Os métodos atuais utilizados para tais, são previstos por órgãos como a *International Organization of Standardization* (ISO) e incluem etapas laboriosas que demandam o tempo de 4 a 7 dias e mão de obra especializada, além de gerarem apenas dados qualitativos quanto à presença ou ausência do agente.

Considerando as desvantagens das técnicas convencionais para detecção e quantificação de espécies de *Salmonella*, o presente estudo propõe variações metodológicas e associação das técnicas de *qPCR* (*Real Time Polymerase Chain*

Reaction) e Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) para agilizar o processo de detecção do agente, bem como gerar dados quantitativos referentes à contaminação da matriz alimentar, carne de frango.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, a demanda global acelerada por produtos cárneos de qualidade, palatabilidade e nutritivos propiciou o crescimento consistente e constante da produção de carne de aves. Repleta de proteínas e com baixo teor de gorduras, além de uma proporção de ácidos graxos poliinsaturados maior quando comparados com outras espécies, a carne de frango é a segunda mais consumida (14,99kg/capita/ano) no mundo, perdendo para a carne de suínos (16,02 kg/capita/ano) mas sendo esperado que assuma a posição dianteira em alguns anos (BERZAGHI et al., 2005; FAO, 2013; OECD-FAO, 2016).

O Brasil segue a tendência mundial, e no quarto trimestre de 2018 foram abatidas 1,42 bilhão de cabeças de frango. O peso acumulado das carcaças foi de aproximadamente 3,34 milhões de toneladas. A região com maior participação na produção foi a Região Sul, absorvendo 60,0% dos abates, seguida pelas regiões: Sudeste (19,0%), Centro Oeste (14,8%), Nordeste (4,2%) e Norte (2,0%) (IBGE, 2018).

Em relação ao processo de abate, Paraná segue liderando amplamente, com 31,7% da participação nacional. O Estado de Minas Gerais (MG) foi responsável por cerca de 5,4% do total de abate de frangos no quarto trimestre do ano de 2018. Desta produção em MG, 20.411 toneladas foram destinadas à exportação (neste mesmo período), representando 2,1% das exportações nacionais. O preço médio do frango resfriado (no Brasil), segundo indicador Cepea/Esalq, foi de R\$4,48/kg, no período de outubro a dezembro de 2018. No quarto trimestre de 2018, o Brasil exportou 961.216 toneladas de carne *in natura* e os principais importadores foram a Arábia Saudita, China e Japão (IBGE, 2018).

Diversos alimentos, com destaque para carnes, quando inapropriadamente manuseados, processados e preparados, podem ser veículos para diversos microrganismos zoonóticos, os quais possuem capacidade de provocar doenças ao ser humano, assim, o incremento mundial na produção e consumo da carne de frango pode trazer perigos à saúde humana. Apesar dos benefícios da carne de frango, como sua elevada proporção de proteína, quando comparada ao teor de gorduras, esta pode se tornar potencial veículo de doenças (CDC, 2019; CRIM et al., 2015).

Durante 2018, *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (FoodNet) identificou 25.606 casos de infecção, 5.983 hospitalizações e 120 mortes, relacionadas a patógenos veiculados por alimentos nos Estados Unidos da América (USA). A incidência de infecção por 100.000 habitantes foi maior para *Campylobacter* (19.5%) e *Salmonella*

(18.3%), seguidas por *Shiga toxin-producing Escherichia coli*. (STEC) (5.9%), *Shigella* (4.9%), *Vibrio* (1.1%), *Yersinia* (0.9%), *Cyclospora* (0.7%) e *Listeria* (0.3%) (MARDER et al., 2018).

A *World Health Organization* (WHO, 2019) afirma que doenças diarreicas são as mais comuns entre as enfermidades veiculadas por alimentos e relaciona os agentes mais causadores destas como: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*., *Vibrio cholerae*, *Norovirus* entre outros. Aponta também os alimentos mais associados à contaminação para tais agentes como: ovos, carne de frango, leite não pasteurizado e outros produtos de origem animal.

Estima-se que 600 milhões de pessoas no mundo adoecem devido ao consumo de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. e que 420.000 morram todos os anos por esta causa (WHO 2019). Nos EUA (Estados Unidos da América), estima-se a ocorrência de cerca de 1,2 milhões de casos, 23.000 hospitalizações e 450 mortes por ano, sendo destes 1 milhão de casos de doenças relacionadas à contaminação proveniente de alimentos (CDC, 2019).

Doenças veiculadas por alimentos geram grandes prejuízos socioeconômicos, segundo HOFFMAN et al., (2015), apenas no ano de 2013 nos EUA, foram estimados gastos de 15,5 bilhões de dólares causadas por estas doenças alimentares. Na Holanda, por exemplo, entre os anos de 2012 e 2013 houve um surto relacionado ao sorovar *Salmonella* Thompson, estimando somente neste período um prejuízo econômico médio de 6,8 milhões de Euros, causado principalmente pelas perdas de produtividade dos infectados (SUIJKERBUIJK et al., 2016).

No Brasil foram notificados 12.503 surtos de doenças veiculadas por alimentos no período de 2000 a 2017, com 182 mortes. Destes, 3.196 foram confirmados laboratorialmente e 2.593 obtiveram identificação do agente etiológico, cerca de 32% estavam relacionados a espécies de *Salmonella*, sendo este o principal microrganismo responsável por surtos no país (SINAN, 2018).

Sorovares de *Salmonella* estão entre os principais microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos no território nacional e no mundo. A cadeia produtiva das aves, com destaque para frangos e perus, possui relação intrínseca com este agente, pois, frequentemente estes animais têm seus intestinos colonizados pela bactéria e não apresentam qualquer sinal clínico, exceto quando acometidos por *Salmonella* Pullorum e *S. Gallinarum*, que provocam a doença nestes animais. A presença de *Salmonella* em aves saudáveis é considerada um dos principais fatores de risco para a transmissão desta aos humanos, já que esta espécie animal é considerada reservatório de alguns sorovares

importantes e comumente envolvidos em infecções humanas (COSBY et al., 2015; ANTUNES et al., 2016; LUO et al., 2017).

Salmonellas são bactérias em formato de bastão, Gram-Negativas, flageladas, anaeróbias facultativas e com tamanho que varia de 2 a 3µm. Possuem capacidade de se multiplicar em temperaturas que variam entre 8°C e 45°C, com temperaturas ótimas de crescimento a 37°C e pH que varia entre 4 a 9,5 (CHLEBICZ & ŚLIŻEWSKA, 2018). Historicamente, esta bactéria foi descrita pela primeira vez por Theobald Smith e Daniel Elmer Salmon em 1885. A classificação deste microrganismo é definida por duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella entérica*, sendo a segunda espécie subdividida em seis subespécies: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtanae (IV) e indica (VI). Existe ainda um esquema de classificação em sorovares chamado de esquema Kaufmann e White. Este esquema é definido a partir da presença de determinantes antigênicos como antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) e antígeno capsular (K ou Vi). O antígeno somático (O) é um oligossacarídeo componente da membrana externa da parede bacteriana; o antígeno flagelar, como o próprio nome implica, está relacionado a motilidade da bactéria e compõe importante função na resposta imune do hospedeiro. Por último, porém não menos importante, o polissacarídeo capsular é mais incomum, mas encontrado na membrana celular do patógeno (LAMAS et al., 2018).

A doença provocada pela infecção deste microrganismo em humanos é conhecida como salmonelose e é dividida em três principais formas, sendo elas: não invasiva não tifoidal, invasiva não tifoidal e febre tifoide. Salmonelose não tifoidal (NTS) é definida como proveniente de qualquer sorotipo que cause a doença em humanos, com exceção dos sorotipos Typhi e Paratyphi A-C. Já os sorotipos Typhi e Paratyphi A-C provocam a febre tifoide e febre paratifoide, doenças caracterizadas por transmissão oral-fecal entre humanos, a partir principalmente de água contaminada. As NTS são caracterizadas por um quadro de gastroenterite aguda e autolimitado. Os principais fatores de virulência relacionados ao agente encontram-se nas ilhas de patogenicidade (SPI's), estas localizam-se em cromossomos e plasmídeos e estão diretamente relacionadas à capacidade de aderência, invasão, colonização e replicação nas células do hospedeiro, assim como a indução da cascata de inflamação (KURTZ et al., 2017; CHLEBICZ & ŚLIŻEWSKA, 2018).

Um número mínimo de células viáveis do patógeno deve ser ingerida para que a doença possa se instalar. Este número é conhecido como dose infectante (FOLEY et al., 2011) variando entre 10^6 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em pessoas

saudáveis, porém doses menores também tem capacidade de provocar a doença em condições específicas, como em pessoas do grupo de risco, formado por crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Apesar de incomum, 5-10% dos infectados, normalmente do grupo de risco, desenvolvem quadros de bacteremia (translocação bacteriana para a corrente sanguínea), que possuem o potencial de levar ao óbito, caso não sejam tratados com antimicrobianos efetivos. Os sintomas clássicos da enfermidade normalmente instalam-se de 6 a 72 h após o consumo de alimentos ou água contaminada e estes incluem: náusea, vômitos, diarreia e dor abdominal. A gastroenterite normalmente se resolve de 5 a 7 dias, sem necessidade de tratamento (YIN & ZHOU, 2018).

A relação da presença do patógeno na cadeia produtiva das aves e a sua presença em carcaças de frango foi demonstrada em diversos trabalhos da literatura internacional, dentre estes, BERRANG et al., (2017) encontraram 15% de positividade em suas 112 amostras de carcaças, já VINUEZA-BURGOS et al., (2019) relataram frequência de 56% de frangos positivos, quando coletados logo após a fase de resfriamento no abatedouro. Outro trabalho, realizado por SHARMA et al., (2019) demonstrou a presença deste microrganismo em 40% de suas amostras.

No Brasil, estudos demonstraram diferentes frequências de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de frango em diferentes localidades. Alguns autores como PANZENHAGEN et al. (2016), relataram valores de aproximadamente 6,7%. Outros trabalhos indicaram frequências próximas de 15% (MOREIRA et al., 2008; CARDOSO et al., 2015). YAMATOOGI et al., (2012) relataram frequência de 60%, após análise de suas amostras. Tais diferenças entre dados nacionais e internacionais pode ser explicada pelo amplo número de técnicas e métodos de coleta, além da realização destas em períodos variados e com diferentes amostras.

A contaminação do produto final, aparentemente inicia na fazenda, disseminando o agente nas várias etapas seguintes da cadeia produtiva. WHAGHAMARE et al., (2018), detectaram ocorrência de 7,4% de *Salmonella* spp. em amostras oriundas de aves e do ambiente em granjas na Índia. A disseminação desta contaminação até o abatedouro frigorífico e demais etapas, pode ser relacionada à captura das aves, transporte, contato com aves silvestres, o ambiente e fezes de animais positivos. Estes fatores também contribuem para o aumento do estresse animal, que pode facilitar e/ou estimular a contaminação das carcaças no abatedouro (BUNCIC & JOFOS, 2012; YAMATOOGI et al., 2016).

No abatedouro, desde a chegada das aves até a embalagem dos produtos finais, existem vários pontos críticos de contaminação. Alguns deles são: depenagem,

evisceração, pré-resfriamento e resfriamento. De forma geral, os processos pelos quais as aves passam (quando realizados de forma correta) reduzem a carga de *Salmonella* spp., segundo BUNCIC & JOFOS (2012), após a passagem das carcaças pelo processo de escaldagem, a contagem bacteriana chega a diminuir 2 unidades logarítmicas.

Salmonella spp. são muito prevalentes e representam riscos à saúde humana, além de gerarem grandes prejuízos financeiros. Autores como CARRIQUE-MAS & DAVIES, já em 2008, afirmaram que métodos específicos e eficientes para isolamento deste agente em alimentos são essenciais e que procedimentos corretos de amostragem devem ser executados para maximizar a detecção do mesmo, garantindo um produto final seguro ao consumidor.

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para detecção de *Salmonella*, dentre eles, os mais aceitos são descritos e recomendados por agências oficiais de segurança alimentar, tais como *US Department of Agriculture (USDA)*, *US Food and Drug Administration (FDA)*, *Association of Official Analytical Chemist International (AOACI)* e *International Organization of Standardization (ISO)*. Estes consistem principalmente de técnicas convencionais de cultura microbiológica (VELUSAMY et al., 2010; MARIA et al., 2016).

Estes procedimentos convencionais de isolamento e identificação de microrganismos compreendem etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e incubação, conduzidos em meios seletivos e diferenciais. Testes moleculares e bioquímicos associados aos métodos supracitados são tradicionalmente utilizados para detectar bactérias em alimentos. Contudo, estes são laboriosos e exigem um período de tempo considerável para a detecção de *Salmonella* (5-7 dias), além de produzirem apenas resultados qualitativos, o que é um problema para a indústria (KIM et al., 2013).

Já o método quantitativo utilizado é descrito pela ISO 6579-2:2012 e consiste de fases de pré enriquecimento em meio não seletivo (Água peptonada tamponada 1%), enriquecimento seletivo em meio semissólido de MSR/V (*Rappaport Vassiliadis Medium*), plaqueamento seletivo em ágar XLD (ágar de desoxicolato lisina xilose) para identificação e confirmação por métodos bioquímicos e sorológicos para posterior cálculo de Número mais provável (NMP).

Técnicas como número mais provável (NMP) estão sendo utilizadas atualmente para a obtenção quantitativa de dados relativos a contaminações bacterianas. A técnica consiste na inoculação de diluições decimais em tubos contendo meios de crescimento e a posterior observação dos resultados e cálculo do número estimado de bactérias presentes em cada diluição, baseado em tabela padrão de NMP. Esta técnica vem sendo utilizada

em várias indústrias. A habilidade de detectar a bactéria alvo em concentrações extremamente baixas (abaixo de 10 a 100 NMP/g), assim como a simplicidade da técnica são suas principais vantagens, porém esta exige um período de incubação maior que 4 dias, sendo ainda necessária a realização de procedimentos posteriores utilizando técnicas moleculares ou bioquímicas para confirmação dos resultados (MARTIN et al., 2004; SUTTON, 2010).

Devido aos pontos negativos apresentados pela técnica de NMP, relacionados principalmente à elevada necessidade de materiais como tubos e meios, modificações e associações desta técnica são realizadas. FRAVALO et al., (2003), propôs alterações da mesma, propiciando utilização de um volume menor de amostras, materiais e mão de obra, desenvolvendo assim, o NMP miniaturizado (mNMP).

Avanços na tecnologia e inovações nas áreas de estudo da microbiologia e biologia molecular estão oferecendo cada vez mais alternativas às técnicas convencionais. Existe grande variedade de *kits* e instrumentos destinados a esse fim. Estas são fundamentadas em diferentes ferramentas de detecção como biologia molecular, imunoenaios, biossensores, dentre outros (VELUSAMY et al., 2010).

Outra ferramenta importante para a detecção de microrganismos em alimentos é o PCR (*Polymerase chain reaction*). Técnicas moleculares baseadas em ensaios utilizando PCR emergiram como uma das principais utilizadas na detecção de patógenos veiculados por alimentos no século XXI (KUMAR et al., 2005; MACIOROWSKI et al., 2005). Ao longo dos anos, a sensibilidade para detecção e identificação de *Salmonella* utilizando-se o PCR vem aumentando, MYINT et al. (2006) realizaram associação de um passo extra de enriquecimento de suas amostras (tecido de aves) que propiciou a detecção de *Salmonella spp.* em todas as amostras testadas, ao utilizar a técnica de PCR. Antes do enriquecimento e testes moleculares, todas suas amostras haviam sido consideradas negativas para o agente, quando técnicas convencionais haviam sido empregadas. A utilização de enriquecimento também é aconselhável para diferenciação de células mortas e células viáveis. Os métodos convencionais de PCR baseiam-se no isolamento, amplificação e quantificação de uma parte pequena do ácido desoxirribonucleico (DNA) dos microrganismos alvo (PESTANA et al., 2010; COCOLIN et al., 2011).

Existem diferentes variações desta técnica, dentre elas há o PCR em tempo real (qPCR). Este é conhecido como um método sensível e específico para quantificação de populações bacterianas em matrizes alimentares. O qPCR, possui potencial para reduzir tanto o tempo de detecção de agentes, como também a mão de obra necessária. A técnica possui como vantagem a capacidade de quantificar o número de patógenos através da

quantificação do DNA bacteriano em tempo real, porém como desvantagens, o preço elevado para obtenção do aparelho necessário para realização das análises, assim como a necessidade de pessoas treinadas para realização da leitura dos resultados também devem ser levados em consideração (BOHAYCHUK et al., 2007; KAWASAKI et al., 2014).

Autores como KIM et al., (2017) propuseram associação de diferentes técnicas visando o aproveitamento dos pontos positivos de cada. Em seu experimento para meios de comparação, foram realizadas técnicas convencionais de detecção como plaqueamento, que levaram a um tempo de detecção superior a 3 dias assim como um limite de detecção alto de 1,00 log UFC/mL (quando comparada às outras técnicas realizadas). A técnica de NMP tradicional também foi testada. Para detecção, esta necessitou de tempo superior a 4 dias, com limite de detecção mais baixo (0,18 log UFC/ml). Já o qPCR demandou período inferior a 4 horas para detecção, porém com um limite mais alto (1,26 log UFC/ml). O autor então propôs a associação dos métodos de NMP e qPCR com um tempo de incubação reduzido e obteve um tempo de detecção inferior a 7 horas, com limite de detecção de (0,18 log UFC/ml), conseguindo, assim, combinar as características vantajosas das duas técnicas.

2.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABPA. Relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 176, 2018.

ANTUNES, P. et al. Salmonellosis : the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>>.

BERRANG, M. E. et al. Detection of *Salmonella* Serotypes by Overnight Incubation of Entire Broiler Carcass. **Journal of Food Safety**, 37: e12298, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1111/jfs.12298>>

BERZAGHI, P. et al. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 128–136, 2005.

BOHAYCHUK, V. M. et al. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. **Journal of Food Safety**, 70(5), 1080–1087, 2007. <<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1080>>

BUNCIC, S., and J. SOFOS. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International** 45:641–655, 2012.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 0, 2015.

CARRIQUE-MAS, J. J.; DAVIES, R. H. Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 27, n. 3, p. 665–677, 2008.

CDC, Center for Diseases Control and Prevention 2019, Acessado em: <https://www.cdc.gov/salmonella/> (Junho 2019)

CHLEBICZ A, ŚLIŻEWSKA K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2018; 15(5):863.

COCOLIN, L. et al. The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. SUPPL. 1, p. S30–S38, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.009>>.

COSBY D. E. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review, **The Journal of Applied Poultry Research**, Volume 24, Issue 3, September, 2015, Pages 408–426, <<https://doi.org/10.3382/japr/pfv038>>

CRIM, S. M. et al. “Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - **Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, 10 U.S. sites, 2006-2014.” **MMWR. Morbidity and mortality weekly report** vol. 64,18: 495-9.

FAO, 2013. Poultry Development Review. Acessado em: <http://www.fao.org/3/i3531e/i3531e.pdf> (Junho 2019).

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Food Supply - Livestock and Fish Primary Equivalent 2017. Acessado em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CL> (Junho 2019)

FOLEY, S. L. et al. MINIREVIEW Population Dynamics of *Salmonella* enterica Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

FRAVALO, P. et al. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: the mini-msrv mpn technique. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, 11: 81-88. 2003 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4581.2003.tb00031.x>>

HERNANDES, R. T. Cross-Contamination and Biofilm Formation by *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards. **Foodborne Pathogens and Disease**. 2018; 15:2, 81-85

HOFFMANN, S.; MACULLOCH, B.; BATZ, M. Economic Burden of Major Foodborne Illnesses Acquired in the United States. **United States Department of Agriculture, Economic Research Service**, n. 140, 2015.

IBGE, 2018 **Indicadores Da Pecuária -Estatística da Produção Pecuária** Out.-Dez 2018.

ISO/TS 6579-2:2012 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique Acessado 12 de Junho. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/56713.html>>

KAWASAKI, S. et al. Characterization and modeling of *Salmonella* growth in pasteurized and non-pasteurized milk using real-time PCR. **Japanese Journal of Food Microbiology**, 31, 28–35, 2014.

KIM, S. A., et al. A rapid and simple screening method of Cronobacter spp. in cell suspension and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1520–1524, 2013.

KIM, S. A. et al. Development of a rapid method to quantify *Salmonella* Typhimurium using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation. **Food Microbiology**, v. 65, p. 7–18, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.013>>.

KURTZ, J. R. et al. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, v. 190, n. May, p. 42–50, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>>.

KUMAR, S., et al. Rapid detection of *Salmonella typhi* in foods by combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 2005; 21: 625. <<https://doi.org/10.1007/s11274-004-3553-x>>

LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella* enterica. **Microbiological Research**, v. 206, n. May 2017, p. 60–73, 2018. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>>.

LUO, Y. et al. Rapid electrochemical quantification of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* based on glucose oxidase and antibody-modified silica nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409 (17), p.4139-4147, 2017.

MACIOROWSKI K. G et al. Polymerase Chain Reaction Detection of Foodborne *Salmonella* spp. in Animal Feeds, **Critical Reviews in Microbiology**, 31:1, 45-53, 2005 <<http://dx.doi.org/10.1080/10408410590912970>>

MARDER Mph, E. P. et al. “Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - **Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, 10 U.S. Sites, 2006-2017.” MMWR. Morbidity and mortality weekly report vol. 67,11 324-328. doi:10.15585/mmwr.mm6711a3, 2018.

MARIA, A. et al. Electrochemical immunosensors for *Salmonella* detection in food. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 5301–5312, 2016. Disponível em: doi:10.1007/s00253-016-7548-y.

MARTIN, B., et al. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Letters in Applied Microbiology**, v 39, p.290-295, 2004. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01580.x

MOREIRA, G. N. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.

MYINT, M. S., et al. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23(6), p. 599–604, 2006. <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.09.002>>

NAM, H.M., et al. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. **International Journal of Food Microbiology** 102, 161e171, 2005.

OECD/FAO (2016), “Meat”, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-10-en

PANZENHAGEN, P. H. N. et al. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243–247, 2016.

PESTANA, E.A. et al. Real-Time PCR – The Basic Principles. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real Time PCR Applications. **Springer**, Netherlands, Dordrecht, 27–46, 2010.

SHARMA J. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes characterization of nontyphoidal *Salmonella* isolated from retail chicken meat shops in Northern India, **Food Control** (2019), doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.021>>

SINAN NET. Brasília, DF: Ministério da Saúde 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>

SUIJKERBUIJK, A. W. M. et al. The economic burden of a *Salmonella* Thompson outbreak caused by smoked salmon in the Netherlands, 2012 – 2013. **European Journal of Public Health**, v. 27(2), p. 325–330, 2017 <<https://doi.org/10.1093/eurpub/ckw205>>

SUTTON, S. The Most Probable Number Method and its uses in enumeration, qualification, and validation. **Journal of Validation Technology**, v. 16, n. 3, p. 35–38, 2010.

VAN ASSELT, E. D. et al. Food Safety Crisis Management—A Comparison between Germany and the Netherlands. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 2, p. 477–483, 2017.

VÁZQUEZ, E. G. et al. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia* **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70777-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70777-2)>.

VELUSAMY V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. **Biotechnol Advances** v. 28 p. 232–254, 2010.

VINUEZA-BURGOS, C. et al. Occurrence , genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from the broiler production chain within an integrated poultry company. **International Journal of Food Microbiology**, v. 299, n. March, p. 1–7, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.014>>.

WAGHAMARE, R. N. et al. Phenotypic and genotypic drug resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from poultry farm and processing units located in and around Mumbai city , **India, Veterinary World**, 11(12): 1682-1688, 2018.

WHO, 2019. World Health Organization, Fact Sheet, Food safety. Acessado em Junho 2019. Disponível em <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>.

YAMATOGLI, R. S. et al. *Salmonella* spp. in poultry carcass: evaluation of sample preparation methods and effect of storage under refrigeration on pathogen recovery. **Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 50-53, 2012

YAMATOGLI, R. S. et al. Qualitative and Quantitative Determination and Resistance Patterns of *Salmonella* from Poultry Carcasses. **Journal of Food Protection** Vol. 79, No. 6, pp. 950-955, 2016.

YIN, Y.; ZHOU, D. Organoid and Enteroid Modeling of *Salmonella* Infection, **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Vol.8, pp.102, April, 2018.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi padronizar uma técnica de identificação e quantificação a partir da união da técnica quantitativa microbiológica mNMP e qPCR para a rápida detecção de *Salmonella* spp., utilizando amostras artificialmente e naturalmente contaminadas com o agente.

3.1 Objetivos específicos

- Testar a técnica em amostras artificialmente contaminadas
- Avaliar a qualidade da técnica em amostras naturalmente contaminada

**4. ARTIGO – Improvement of mNMP technique associated with qPCR for
quantification of *Salmonella* spp. in retail poultry carcasses**

Bruno Melo Gaspar et al., 2019

Improvement of mNMP technique associated with qPCR for quantification of *Salmonella* spp. in retail poultry carcasses

Bruno Melo Gaspar¹; Juliana Líbero Grossi¹; Luis Augusto Nero¹; Ricardo Seiti Yamatogi^{1*}

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus UFV, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus UFV, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. RS Yamatogi, e-mail: ryamatogi@ufv.br

RESUMO

GASPAR, Bruno, M., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2019. **Improvement of mNMP technique associated with qPCR for quantification of *Salmonella* spp. in retail poultry carcasses**

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi. Coorientador: Luís Augusto Nero.

A Salmonelose é uma enfermidade veiculada por alimentos que provoca sintomas relacionados principalmente ao trato gastrointestinal, como diarreias e vômitos, podendo também apresentar quadros de infecção sistêmica e até levar ao óbito. O microrganismo responsável pela doença é *Salmonella* spp.. A pesquisa, identificação e quantificação da *Salmonella* spp. é de grande interesse e importância a indústria, para garantir ao consumidor final um produto seguro. Apesar disto, os métodos de detecção convencionais são demorados e laboriosos, exigindo um período de 5 a 7 dias para conclusão, além de fornecerem apenas dados de caráter qualitativo. O presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de reduzir o tempo de detecção e fornecer resultados quantitativos utilizando uma associação das técnicas de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) e *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). A técnica mNMP+qPCR foi padronizada e comparada com a técnica tradicional (mNMP) em amostras artificialmente contaminadas, obtendo-se resultado similar e constatando-se sua aplicabilidade e eficiência. Em amostras artificialmente contaminadas, 50 carcaças de frango congelado foram adquiridos em mercados varejistas, ao longo do segundo semestre de 2018 e primeiro semestre de 2019, e testados pela microbiologia tradicional, quantificados pela técnica mNMP e mNMP+qPCR. Os resultados obtidos indicaram uma frequência de 38% de *Salmonella* spp., quando analisados os dados de ambas as técnicas aplicadas. A microbiologia convencional foi capaz de detectar 8% de positividade, enquanto a técnica associada de mNMP e qPCR detectou 34%. O intervalo de detecção das técnicas associadas foi de aproximadamente 36 horas e a partir destas foi possível quantificar a contaminação pelo agente. A quantificação das amostras positivas foi expressa em NMP/g e variou entre 0,35 NMP/g e 59NMP/g, sendo esta quantificação, um dado alarmante, que indica um grau de contaminação importante neste tipo de produto.

Palavras chave: *Salmonella*, Quantificação, Identificação, qPCR, mNMP.

ABSTRACT

GASPAR, Bruno, M., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2019. **Improvement of mNMP technique associated with qPCR for quantification of *Salmonella* spp. in retail poultry carcasses**

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi. Coorientador: Luís Augusto Nero.

Salmonellosis is a foodborne disease that causes symptoms related mainly to the gastrointestinal tract, such as diarrhea and vomiting, and may also present systemic infections and even lead to death. The microorganism responsible for the disease is *Salmonella* spp.. This bacterium generates several outbreaks annually in various countries, as well as major economic losses. This agent is very prevalent in the poultry industry, as it is a naturally occurring bacterium in the gastrointestinal tract of these animals. The research, identification and quantification of *Salmonella* spp. is of great interest and importance to the industry to guarantee the end consumer a safe product. Despite this, conventional detection methods are currently laborious and require a period of 5-7 days to complete providing only qualitative data. The present work was developed to reduce detection time and to produce quantitative results using a combination of Miniaturized Most Probable Number (mMPN) and Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) techniques. After standardization of the technique in samples artificially contaminated, the technique demonstrated its applicability in natural occurring *Salmonella* spp. samples. Posteriorly, 50 frozen chicken carcasses of 5 different brands were bought from retail, during the second semester of 2018 and first semester of 2019, processed and stocked. They were then subjected to the traditional microbiology technique using the Bacteriological Analytical Methods (BAM) and the association of mMPN and qPCR. The results indicated a frequency of 38% of *Salmonella* spp., when analyzing the combined data of both techniques applied. Conventional microbiology was able to detect 8% of positivity, while the associated mMPN and qPCR technique detected 34%. The detection interval of the associated techniques was approximately 36 hours and from these it was possible to quantify the contamination by the agent. Quantitation of positive samples was expressed in MPN / g and ranged from 0.35 MPN / g to 59 MPN / g, and this quantification is alarming, indicating a significant degree of contamination in this type of product.

Keywords: *Salmonella*. Quantification. Identification. qPCR. mMPN.

1.INTRODUÇÃO

Alimentos são potenciais veículos de diversos patógenos que podem causar doenças e prejuízos econômicos importantes a diversos países. Segundo HOFFMANN et al., (2015) estimaram, nos Estados Unidos da América, gastos aproximados de 15,5 bilhões de dólares com doenças relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Entre os principais agentes causadores de doenças, destaca-se a *Salmonella*, gerando grandes prejuízos econômicos ao redor do mundo, principalmente ligados ao consumo de carne de frango (DANTAS et al., 2018). Segundo dados norte-americanos, estima-se que infecções por este agente provoquem 1,2 milhões de casos ao ano, 23.000 hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2019).

A doença zoonótica provocada por este microrganismo é chamada de salmonelose e pode levar a diversos sintomas, como dores de cabeça, vômito, diarreia, hipertermia e outros. Normalmente, a infecção por *Salmonella* causa gastroenterites autolimitadas, no entanto, dependendo do sorovar esta infecção pode ser sistêmica e levar ao óbito (VÁZQUEZ et al., 2014; YIN; ZHOU, 2018). Afim de controlar este problema, métodos específicos e sensíveis para detecção, identificação e quantificação de *Salmonella* spp. são essenciais para garantir qualidade e segurança dos alimentos (CARRIQUE-MAS & DAVIES, 2008; VAN ASSELT et al., 2017).

Os métodos tradicionais utilizados atualmente para detecção deste patógeno consistem de etapas múltiplas, delongadas e laboriosas, que demandam mão de obra treinada e especializada, além de um período de 5 a 7 dias para sua conclusão, fornecendo apenas resultados qualitativos quanto à presença ou ausência do patógeno (KIM et al., 2013). Técnicas para quantificação são normalmente executadas a partir de métodos relacionados ao Número Mais Provável (NMP), previstas pela *International Organization of Standardization (ISO)*, porém, semelhantemente aos métodos convencionais, também demandam tempo delongado e extensivo uso de materiais e mão de obra.

Alternativas para detecção e quantificação deste agente podem surgir da associação de técnicas já utilizadas. Segundo KIM et al., (2017) a união dos pontos positivos destas, pode ser uma alternativa para promover execução mais rápida, barata e simples. Em seu trabalho, estes autores executaram uma técnica associada de NMP e qPCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*), reduzindo o tempo de incubação e obtiveram resultados mais rápidos e sensíveis de detecção e quantificação de

Salmonella Typhimurium em amostras artificialmente contaminadas.

Considerando as desvantagens das técnicas convencionais para detecção e quantificação do gênero *Salmonella*, o presente estudo propõe avaliar variações metodológicas e associação das técnicas de *qPCR* e Número Mais Provável miniaturizado (mNMP) para agilizar o processo de detecção do agente, bem como gerar dados quantitativos referentes à contaminação da matriz alimentar carne de frango, ao nível de varejo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Teste in vitro para detecção quantitativa de *Salmonella* spp.

2.1.1 Preparação do inóculo

Uma cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, proveniente da coleção do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Veterinária da UFV (Universidade Federal de Viçosa), foi recuperada em tubo contendo caldo de Infusão de cérebro coração (BHI), incubada a 37°C por 18-24 horas e posteriormente semeada em placa de Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e novamente incubada a 37°C por 18-24 horas. Colônias provenientes da placa de XLD foram transferidas para solução de cloreto de sódio a 0,85%, formando uma suspensão celular, esta foi mensurada em espectrofotômetro até atingir a Densidade Óptica (DO) de 0,125, utilizando-se comprimento de onda $\lambda = 550$ nanômetros (nm).

A suspensão celular foi submetida a diluições decimais seriadas, para obtenção de variações logarítmicas até a sétima unidade. A população de *Salmonella* presente nas alíquotas utilizadas foi confirmada através do plaqueamento em triplicata das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , sendo inoculadas porções de 100 μ L de cada diluição e espalhadas em superfície com auxílio de alça de Drigalski sobre ágar XLD. Após incubação de 18-24h a 37°C destas, a população média obtida foi expressa em Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL) e comparadas com as diluições, afim de confirmar a quantificação pela absorbância.

2.1.2 Preparação da amostra

Carcaças de frangos inteiros congeladas, adquiridas do mercado varejista, foram submetidas ao método microbiológico convencional, seguindo o *Bacteriological Analytical Methods* (BAM), proveniente da *Food and Drug*

Administration (FDA), conforme ANDREWS et al. (2014), para confirmação da ausência de *Salmonella*. A partir das carcaças de frango negativas para o respectivo agente, foram excisadas porções de pele e músculo das regiões de cloaca, ambas as asas, ambas as coxas e sobrecoxas, pescoço, e peito até obter-se peso de 25g, a serem utilizados nos ensaios de contaminação artificial.

2.2 Padronização do método de Número Mais Provável Miniaturizado (mNMP) com o método rápido (mNMP+qPCR) em amostras artificialmente contaminadas.

2.2.1 Preparo das amostras artificialmente contaminadas

As porções de 25g de frango previamente preparadas foram inoculadas com os equivalentes a 10.000 (10^4), 1000 (10^5), 100 (10^6) e 10 (10^7) células bacterianas de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, preparadas conforme item 2.1.1. Estas foram então homogeneizadas 4 vezes durante 2 minutos, em quatro intervalos de 15 minutos. Após este período, a amostra foi submetida à Técnica de Número Mais Provável Miniaturizado - mNMP tradicional e ao método associado.

2.2.2 Técnica de Número Mais Provável Miniaturizado - mNMP

Para a realização da técnica de mNMP, baseamos o trabalho na ISO/TS 6579-2:2012(E). A partir das amostras artificialmente contaminadas, utilizou-se um total de 25g de músculo com pele, adicionados de 225ml de Água Peptonada Tamponada a 1% (APT 1%). O produto foi submetido a homogeneização por 3 minutos em *Stomacher*® e distribuído em placa de 12 poços. Nesta placa, cada poço da primeira fileira recebeu uma alíquota de 2,5mL do homogeneizado, sendo o restante dos poços preenchidos com 2mL de APT. Três diluições 1:5 subsequentes (500µL em 2000µL) foram realizadas para posterior incubação por 18-24 horas a 37°C, sendo estas etapas realizadas em triplicata e concluindo, assim, a fase de pré-enriquecimento. Foram testadas as amostras com os 4 tipos de inóculos (10.000, 1000, 100 e 10).

Após o período de incubação, 20µL de cada poço foram transferidos para placas contendo MSR/V (Rappaport-Vassiliadis Semissólido) e incubados a 41,5°C por 24 horas. Além disso, alíquotas de um 1mL da solução pré-enriquecida de cada poço, foram coletadas, armazenadas em microtubos de 1,5mL e congeladas a -20°C, para realização de testes moleculares posteriores (Figura 1).

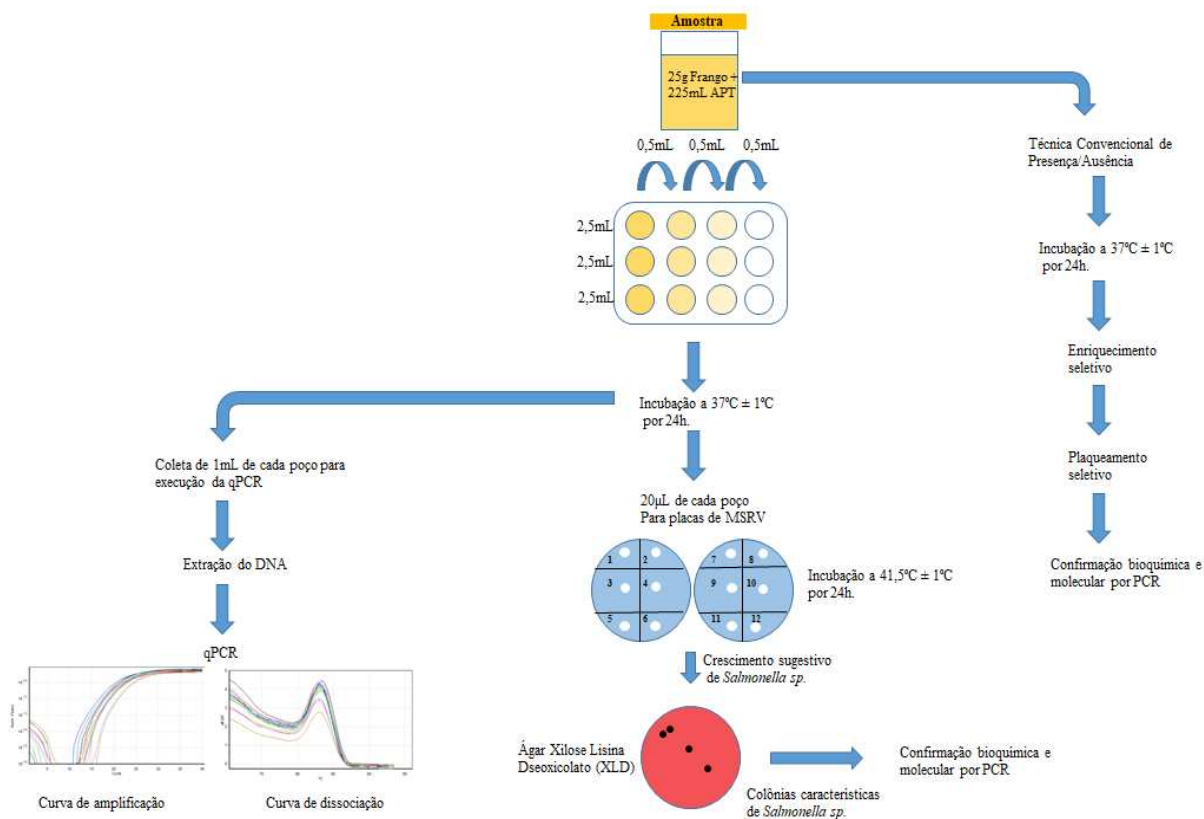


Figura 1: Organograma referente às técnicas (microbiologia convencional, mNMP e mNMP+qPCR) e os procedimentos adotados para comparação da técnica rápida e convencional.

A partir do meio MSR, as amostras que apresentaram mudança de cor azul para branco foram consideradas típicas para *Salmonella* e plaqueadas em ágar XLD. As colônias típicas foram então testadas bioquimicamente, utilizando-se os ágaros LIA (*Lysine Iron Agar*) e TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) confirmadas pela técnica de PCR por meio do gene *invA* segundo SALEHI et al., 2005.

Os resultados obtidos a partir de cada poço (presença ou ausência de *Salmonella*) foram analisados com a ajuda da tabela de Hoskins.

2.2.3 Associação das técnicas de mNMP e qPCR (método rápido)

A partir das alíquotas de 1mL, armazenadas da fase de pré-enriquecimento utilizado na análise de mNMP (conforme item 2.2.2), foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo-real (qPCR) para a identificação do agente.

2.3 Obtenção do DNA

Para a obtenção do DNA, 1 mL de cada um dos poços foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* (sedimento) formado

foi ressuspensionado em 1mL de solução tampão de fosfato (PBS – 0,146M NaCl, 0,01M PO₄²⁻, pH 7,2), sendo posteriormente centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 0,2mL de solução tampão de fosfato. As amostras foram extraídas com auxílio do Chelex 100® (BIORAD) na proporção 1:1 em concentração do produto a 5%. O produto foi então aquecido até atingir a temperatura de 100°C por 10 minutos e então centrifugado novamente a 10.000g por 10 minutos. O DNA (sobrenadante) adquirido foi armazenado em microtubos de 1,5ml, para a realização da qPCR.

2.3.1 Identificação do agente pela qPCR

Os primers descritos por MALORNY et al. (2004), (tabela 1) foram utilizados na qPCR para quantificação. A PCR foi realizada com auxílio do kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega®), conforme as recomendações do fabricante, constituindo um volume final de 20 µL de reação, 200nM de cada primer e 2 µL de DNA extraído. As amostras foram colocadas no equipamento Rotor-Gene (Qiagen) de detecção contínua da fluorescência, com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com a inclusão da curva de dissociação para avaliação da temperatura de *melting* obtida. Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, através da substituição da amostra por água ultrapura e controle positivo, utilizando uma cepa padrão de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Tabela 1: Iniciadores (MALORNY et al., 2004) utilizados na reação de qPCR para a identificação do gênero *Salmonella* spp.

Designação	Sequência	Posição	TM(°C)*
ttr-6 (Forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	4287–4309	57
ttr-4 (Reverse)	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	4359–4381	58

*TM = Temperatura de *Melting*

2.4 Quantificação de *Salmonella* spp. em amostras naturalmente contaminadas

2.4.1 Coleta e preparação das amostras

Durante o quarto bimestre de 2018 e o primeiro semestre de 2019, foram coletados do mercado varejista um total de 50 frangos congelados de 5 marcas diferentes. Os frangos foram descongelados lentamente *overnight em* refrigerador e processados na manhã seguinte. Destes, amostras de músculo e pele foram excisados

(asas, coxas, sobrecoxas, pescoço, peito e ao redor da cloaca) e pesados até obtenção de 25g.

2.4.2 Detecção e quantificação de *Salmonella* spp. utilizando-se as técnicas de mNMP e mNMP + qPCR

As amostras naturalmente contaminadas foram previamente pesadas e submetidas as técnicas conforme item 2.2.2 (método oficial ISO mNMP) e item 2.2.3 (método rápido mNMP+qPCR). Conjuntamente com a técnica quantitativa, a técnica qualitativa de detecção de *Salmonella* spp., conforme BAM (ANDREWS et al., 2014) foi realizada e confirmada a presença do patógeno por meio da PCR (Figura 1). Os resultados quantitativos obtidos pela técnica tradicional e pela técnica rápida foram comparados na tabela de Hoskins.

2.5 Análise estatística

Os valores quantitativos (NMP/g) de ambas a técnicas testadas (mNMP e mNMP+qPCR) foram analisados de forma descritiva. Os resultados qualitativos entre a microbiologia convencional e a metodologia molecular (qPCR) foram expressos em tabulação cruzada com auxílio do software RSTUDIO (2015). As características do qPCR, como sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos dos testes positivos e negativos, foram estimadas para avaliar a acurácia do teste em diagnosticar a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frango a varejo (DOHOO et al., 2009).

3.RESULTADOS

Inicialmente, ambas as técnicas foram testadas em amostras artificialmente contaminadas, a fim de verificar a similaridade dos resultados. As amostras com inóculos entre 10.000, 1.000 e 100 bactérias apresentaram resultados contíguos conforme Figura 2, demonstrando que ambas as metodologias mantiveram a escala

logarítmica de contaminação proposta. As amostras com inóculos de no máximo 10 células não foram detectadas em ambas as técnicas.

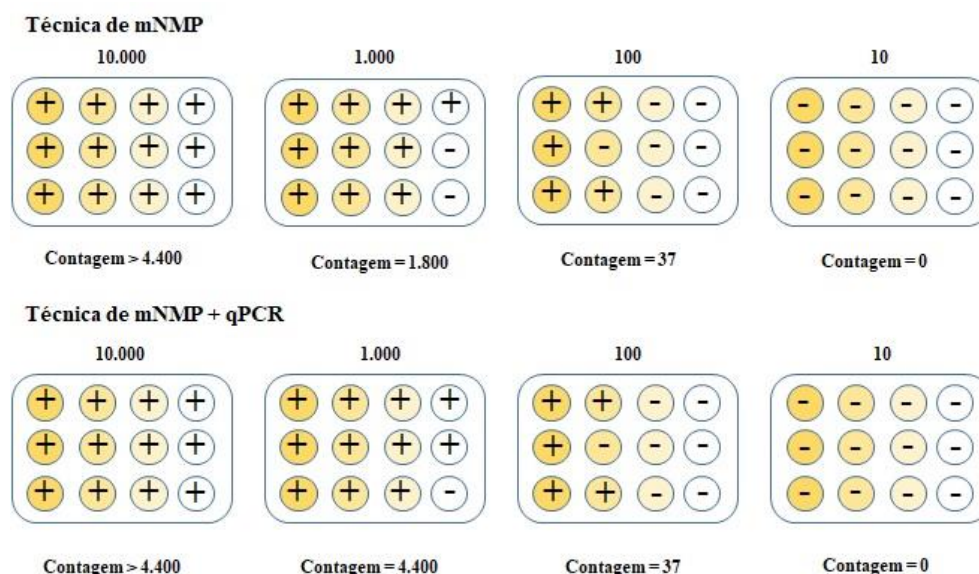


Figura 2: Comparação das técnicas de mNMP tradicional e mNMP + qPCR, para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras artificialmente contaminadas.

Entre as 50 carcaças de frango analisadas nas amostras naturalmente contaminadas, encontrou-se uma frequência geral de 36% (n=18). Avaliando individualmente cada técnica, a microbiologia convencional detectou de 8% (n=4) de carcaças positivas para *Salmonella*, enquanto o método associado de mNMP + qPCR propiciou a identificação de 34% (n=17).

Comparando a microbiologia convencional (MC) com a qPCR pode-se observar um desempenho superior da técnica molecular, conforme dados apresentados na Tabela 2. A MC apresentou uma sensibilidade de 17,8% em relação a qPCR. Esta, quando comparada a MC, demonstrou especificidade relativa de 96,7%, além de um valor preditivo de 75,0%, que indica a confiabilidade da comparação.

Tabela 2: Comparação da metodologia microbiológica convencional com a qPCR por meio de tabulação cruzada para a determinação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo entre as duas técnicas testadas.

		qPCR				
		Positivo	Negativo	Total		
MC*	Positivo	3	1	4	Sensibilidade Relativa:	17,8%
	Negativo	14	32	46	Especificidade Relativa:	96,7%
	Total	17	33	50	Valor Preditivo do Teste:	75,0%

*MC = Microbiologia Convencional

As amostras naturalmente contaminadas apresentaram um total de 34% de carcaças positivas para *Salmonella* spp. As contaminações por este agente, foram divididas em 3 categorias (i, ii e iii) e expressas em NMP/g, sendo estas: categoria i ($>0,35$ e $\leq 1,0$ NMP/g), ii ($\geq 1,0$ e $\leq 3,0$ NMP/g) e iii (>3 NMP/g). Do total de 50 amostras, 33 carcaças apresentaram quantificação não detectável e os valores foram expressos em $<0,35$ NMP/g (Figura 3). No total das amostras consideradas quantificáveis para *Salmonella*, 6 foram classificadas como categoria i, 9 como ii e 2 amostras como iii (Figura 3). As contaminações absolutas variaram entre 0,35 NMP/g e 59 NMP/g. Tanto a detecção de *Salmonella* spp., quanto a quantificação deste agente nas amostras naturalmente contaminadas foi realizada em período inferior a 36 horas.

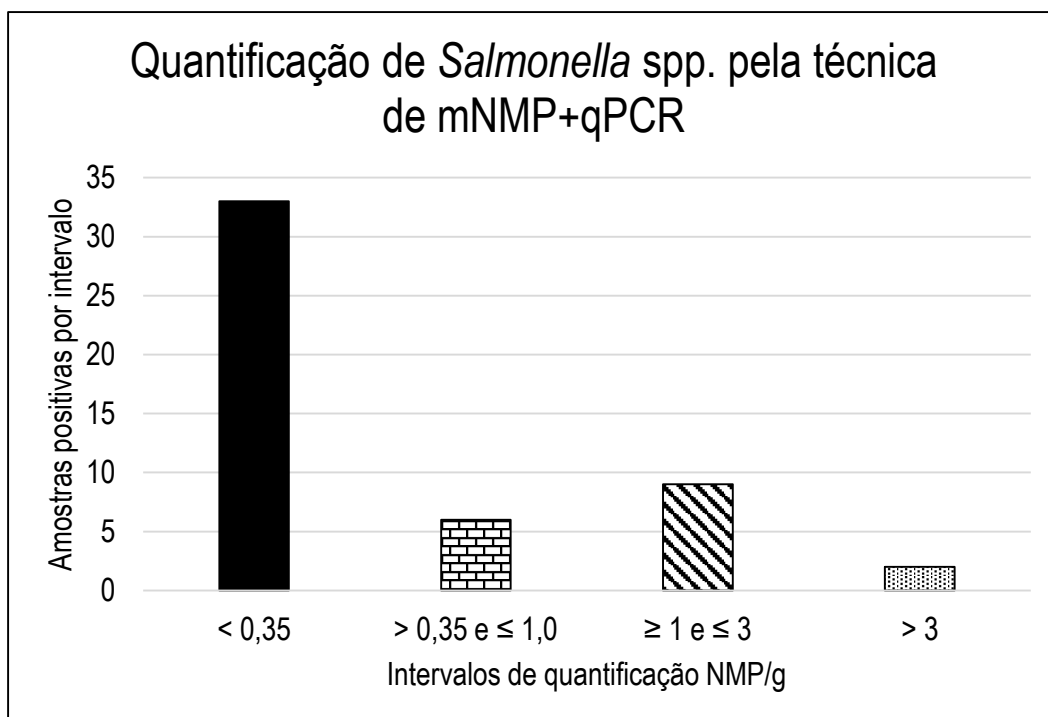


Figura 3: Representação das 50 amostras realizadas pela técnica de mNMP+qPCR em três categorias: categoria i ($>0,35$ e $\leq 1,0$ NMP/g), ii ($\geq 1,0$ e $\leq 3,0$ NMP/g) e iii (>3 NMP/g) e as não quantificáveis ($<0,35$).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo constatou presença de *Salmonella* spp. em 17 (34%) das 50 amostras coletadas na região de Viçosa. Este dado, aparentemente elevado, fortalece as informações presentes na literatura. Alguns estudos realizados em diversas localidades do mundo também demonstram a presença deste agente. Nos Estados Unidos da América (EUA), BERRANG et al., (2017), analisaram 112 carcaças, imediatamente após o processo de resfriamento, detectando aproximadamente 15%

destas amostras positivas para o agente estudado. Já na Coreia do Sul, CHON et al. (2015) detectaram 9,2% das 120 amostras de carcaças em abatedouros da região Sul de seu país.

Os dados brasileiros relacionados a detecção de *Salmonella* spp. em carcaças e cortes de frango são bem diversificados. Autores como SANTOS et al. (2000) e RIBEIRO et al. (2007), obtiveram resultados de detecção semelhantes ao presente trabalho sendo respectivamente de 32% e 39,3%, corroborando os dados deste trabalho. No geral, outros estudos demonstraram variações entre 0 e 72% de detecção, sendo que a frequência do patógeno varia em cada região e localidade do país, assim como de acordo com os momentos das coletas, tipos de amostra e com as técnicas utilizadas (SILVA et al., 2002; COSSI et al., 2012; YAMATOJI et al., 2012; TRAINOTTI et al., 2013; BRIZIO et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; FERNANDES et al., 2016 e PANZENHAGEN et al., 2016).

Diferentes unidades analíticas e diferentes momentos de coleta aparecem como fatores que impactam sobre os resultados obtidos, FLETCHER (2006), constatou que historicamente existem diferenças de incidência de *Salmonella* em carcaças de frango do varejo quando comparados a resultados obtidos na indústria. Dois fatores aparecem como os principais relacionados a esta variação, localização da coleta das amostras e diluição das amostras. As técnicas utilizadas para detecção deste agente em carcaças normalmente envolvem técnicas de microbiologia convencional.

Comparativamente em nosso trabalho a microbiologia convencional apresentou-se pouco sensível para detecção de *Salmonella* spp. em nossas amostras, enquanto a qPCR demonstrou uma capacidade de detecção superior, porém com suas limitações, como por exemplo o fato de não ser viável a realização das análises diretamente da matriz alimentar, já que extratos como proteínas e ácidos graxos presentes na matriz, alteram e prejudicam a leitura e confiabilidade do qPCR GRAZIANO et al. (2018).

A elevada contaminação do produto final parece ser causada por múltiplos fatores em toda cadeia produtiva. Ainda na granja, as aves apresentam contato com um ambiente que pode propiciar a disseminação de *Salmonella* spp. WAGHAMARE et al., (2018) detectaram este micro-organismo em 7,4% das amostras provenientes de aves e do ambiente em granjas na Índia. Outro estudo, realizado em 2012, por WINDHORST et al. (2012), demonstra que alguns sorovares de *Salmonella* são capazes de gerar biofilmes no ambiente de produção (granja), aumentando a

prevalência e, conseqüentemente, a difusão do agente no ambiente. Esta contaminação proveniente da fazenda, pode se propagar para outros animais durante alguns pontos, como a captura e transporte destes animais ao abatedouro, além do contato destes com fezes contaminadas. Processos relacionados ao estresse dos animais, podem também ser fatores que facilitam ou estimulam a contaminação das carcaças no abatedouro (BUNCIC & JOFOS, 2012).

Na cadeia de abate, alguns processos, como a evisceração, possuem o potencial de disseminar o microrganismo, já que este pode estar presente no intestino das aves abatidas (COSBY et al., 2015). Porém, estudos indicam que em geral, as etapas do abate (quando realizadas corretamente) reduzem a carga de *Salmonella*. A escaldagem, processo no qual a ave é imersa em água quente, chega a reduzir a contaminação em 2 unidades logarítmicas. O resfriamento, onde a ave é imersa em água clorada (5 partes por milhão) a 5°C também desempenha papel nesta redução (BRASIL, 1998; BUNCIC & JOFOS, 2012; YAMATOIGI et al. 2012). Contudo, quando parâmetros como densidade de carcaça, temperatura da água, proporção de cloro livre e outros não são seguidos, estes processos podem tornar-se potenciais disseminadores do agente no abatedouro (HUANG et al., 2015).

No mercado, fatores como acondicionamento, refrigeração e venda da carcaça inteira ou em cortes, contribuem para diferentes resultados de detecção. Em frangos congelados, provenientes de supermercados em Trinidad Tobago, KHAN et al., (2018) não isolaram nenhuma amostra positiva para *Salmonella*, enquanto de 190 carcaças frescas não resfriadas, a equipe isolou o agente em 43 destas (22,6%).

A grande variação de detecção pode também ser relacionada a fatores como os métodos de amostragem e as técnicas empregadas. Existem atualmente diversas técnicas de detecção para *Salmonella*. Aquelas previstas por agências internacionais, como FDA (*Food and Drug Administration*) e *United State Department of Agriculture (USDA)* são principalmente compostas por técnicas de microbiologia convencional e são descritas por órgãos como a ISO (*International Organization of Standarization*). Existem ainda técnicas moleculares, imunoensaios, biosensores e outras. Estas possuem diferentes níveis de sensibilidade e especificidade e com a emergente necessidade de resultados rápidos e confiáveis, mais técnicas vem sendo testadas e desenvolvidas (YOON et al., 2016).

Segundo KIM et al., (2017) as técnicas de microbiologia convencional normalmente envolvem etapas longas e laboriosas, provendo apenas resultados

qualitativos. Estas possuem limites de detecção altos (1 log UFC/mL) e demandam tempo superior a 3 dias para confirmação do agente. As técnicas de NMP possuem limites de detecção extremamente baixos (0,18 log UFC/mL), porém, em semelhança às técnicas convencionais, necessitam de um longo tempo para detecção.

Outra técnica muito utilizada e que possui aplicações diversas é a qPCR. Autores como KATSURI & DRGON (2017), demonstraram sua capacidade de detectar 55% mais resultados positivos que outras técnicas consideradas sensíveis, como VIDAS (*Vitek immunodiagnostic assay system*). Além disso, esta técnica é capaz de detectar uma única cópia de DNA genômico de *Salmonella* com uma probabilidade de 50%. Outra vantagem da técnica de qPCR é a quantificação do agente alvo.

Em um estudo, RUBIO et al., (2017) demonstraram a capacidade da técnica em contabilizar a contaminação, por meio da análise dos dados de amplificação e valores de Ct (*cycle threshold*), ligando estes ao material genético do microrganismo estudado e, conseqüentemente, ao número de bactérias nas amostras. A qPCR é uma importante ferramenta de detecção rápida de agentes potencialmente perigosos à saúde humana e animal. Neste trabalho a técnica de qPCR apresentou-se mais sensível à detecção de *Salmonella* spp. em comparação à técnica convencional.

No presente estudo, a quantificação do patógeno em amostras artificialmente contaminadas apresentou similaridade à técnica microbiológica convencional (mNMP) quando comparada à técnica rápida. No entanto, a sensibilidade referente a quantificação de *Salmonella* spp. das amostras naturalmente contaminadas foi melhor através da associação das técnicas de mNMP e qPCR. A contaminação foi determinada em NMP/g e variou entre 0,35 e 59 NMP/g. Trabalhos semelhantes realizados nacionalmente e internacionalmente obtiveram resultados de quantificação que variaram entre <0,03 a 2.400 NMP/g (YAMATOOGI et al., 2016; TRIMOULINARD et al., 2017 e PRASERTSEE et al., 2019). Autores como SHASHIDHAR et al., (2011) e KHAN et al., (2018), realizaram suas pesquisas com amostras de carne de frango do varejo e seus resultados foram semelhantes ao presente trabalho, com variação entre 1,30 e 18 MPN/g.

Outro ponto importante encontrado no trabalho é a determinação de uma baixa quantidade de *Salmonella* em amostras do varejo, sugerindo uma baixa quantidade do patógeno no produto final. A diminuição da quantidade do patógeno é influência das diversas etapas que ocorrem na cadeia produtiva, reduzindo a carga bacteriana do produto final. Segundo YAMATOOGI et al. (2016), o número de microrganismos após

os processos industriais cai consideravelmente e a simulação do varejo tende a diminuir ou estabilizar esta quantidade.

Os resultados de quantificação são importantes para a determinação de risco e para traçar estratégias, visando reduzir e prevenir que perigos como a contaminação por este agente aconteçam tanto na cadeia produtiva, quanto nas residências dos consumidores (RAJAN et al., 2017).

Desta forma, trazer dados quantitativos, como realizado por este trabalho, de forma rápida e com técnicas sensíveis são alternativas para obtenção de dados mais seguros proporcionando uma análise de risco confiável e fidedigna.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a capacidade, viabilidade e acurácia da associação das técnicas de mNMP e qPCR, para quantificar contaminações por *Salmonella* spp. em carcaças de frango do varejo, além de reduzir o tempo de detecção deste agente para 36 horas. Os resultados apresentados podem ainda, prover material, para que processos de análise de risco possam ser realizados, promovendo melhorias à saúde pública.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella* Bacteriological analytical manual, 8th ed. **AOAC International**, 2014, Gaithersburg, Md.

BERRANG, M. E. et al. Detection of *Salmonella* Serotypes by Overnight Incubation of Entire Broiler Carcass. **Journal of Food Safety**, 37: e12298, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1111/jfs.12298>>

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria N° 210, de 10 de Novembro de 1998.

BRIZIO, A. P. et al. Carcaças de Frango resfriadas: estudo sobre a prevalência de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Campylobacter* spp. XII Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, **Blucher Food Science Proceedings**, Volume 1, Pages 369-370, 2014 <<http://dx.doi.org/10.1016/foodsci-microal-186>>

BUNCIC, S., and J. SOFOS. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Res. Int.** 45:641–655, 2012.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 0, 2015.

CARRIQUE-MAS, J. J.; DAVIES, R. H. Sampling and bacteriological detection of Salmonella in poultry and poultry premises: a review. **Revue scientifique et technique**, International Office of Epizootics, v. 27, n. 3, p. 665–677, 2008.

CDC, Center for Diseases Control and Prevention 2019, Acessado em <https://www.cdc.gov/salmonella/> (Junho 2019).

CHON, J. et al. High Occurrence of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing *Salmonella* in Broiler Carcasses from Poultry Slaughterhouses in South Korea **Foodborne Pathogens and Disease** v. 12, n. 3, p. 190–196, 2015.

COSBY, D. E. et al. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers : A review The **Journal of Applied Poultry Research**, Volume 24, Issue 3, Pages 408–426, 2015 <<https://doi.org/10.3382/japr/pfv038>>

COSSI, M. V. C. et al. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and Salmonella spp. occurrence. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1675-1681, 2012.

DANTAS S. T. A. et al. Cross-Contamination and Biofilm Formation by Salmonella enterica Serovar Enteritidis on Various Cutting Boards, **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018 15:2, 81-85

DOHOO I. et al. **Veterinary Epidemiologic Research**. 2nd edn. Charlottetown, Canada: VER Inc, 2009.

FERNANDES, R. T. V. et al. Physicochemical and microbiological parameters of frozen and chilled chicken meat. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 7, p. 417-421, 2016.

FLETCHER, D. L. Influence of Sampling Methodology on Reported Incidence of Salmonella in Poultry. *Journal of AOAC International* Vol. 89, No. 2, 2006.

GRAZIANO, S., GULLÌ, M. and MARMIROLI, N., Detection of allergen coding sequences of kiwi, peach, and apple in processed food by qPCR. **Journal of Science Food Agriculture**, 98: 3129-3139, (2018). Doi:10.1002/jsfa.8814

HOFFMANN, S. et al. Economic Burden of Major Foodborne Illnesses Acquired in the United States. **United States Department of Agriculture, Economic Research Service**, n. 140, 2015.

HUANG, J. et al. Quantitative surveys of Salmonella and Campylobacter on retail raw chicken in Yangzhou, China. *Food Control* 59:68–73, 2015.

KASTURI KN, DRGON T. Real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in environmental samples. **Appl Environ Microbiol** 83:e00644-17, 2017. <<https://doi.org/10.1128/AEM.00644-17>>

KHAN, A. S. et al. Prevalence and serotypes of Salmonella spp . on chickens sold at retail outlets in Trinidad. **PLoS ONE** p. 1–18, 2018. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202108>>

KIM, S. A. et al. A rapid and simple screening method of Cronobacter spp. in cell suspension and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1520–1524, 2013.

KIM, S. A. et al. Development of a rapid method to quantify Salmonella Typhimurium using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation. **Food Microbiology**, v. 65, p. 7–18, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.013>>.

LEE, K. et al. Review of Salmonella detection and identification methods : Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264–276, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>>.

MALORNY, B. et al. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7046–7052, 2004. <<https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7046>>

PANZENHAGEN, P. H. N. et al. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243–247, 2016.

PRASERTSEE, T. et al. Quantification and rep - PCR characterization of Salmonella spp. in retail meats and hospital patients in Northern Thailand. **Zoonoses Public Health** 66: 301– 309, 2019. <<https://doi.org/10.1111/zph.12565>>

RAJAN, K. et al. Current aspects of Salmonella contamination in the US poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding emerging hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, 43:3, 370-392, 2017, doi: 10.1080/1040841X.2016.1223600

RIBEIRO, A. R. et al. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: Occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 296–299, 2007.

RUBIO, S. et al. Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of Salmonella Gallinarum and Salmonella Pullorum. **Avian Pathology**, 46:6, 644-651, 2017, doi: 10.1080/03079457.2017.1339866.

RSTUDIO Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

SALEHI, T. Z. et al. Detection of InvA gene in isolated Salmonella from broilers by PCR method. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 8, p. 557–559, 2005.

SANTOS, D. M. S. et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39–42, 2000.

SHASHIDHAR, R. et al. Quantification of Salmonella in Food Samples from India Using the MINI-MSRV MPN and Modified MINI-MSRV MPN Methods **Journal of Food Science**, 76: M564-M567, 2011, doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02366.x

SILVA, J. A. et al. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 97-101, 2002.

TRAINOTTI, A. C. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de frangos industrialmente processados procedentes de explorações industriais da região Noroeste do estado do Paraná - Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1965-1970, 2013.

TRIMOULINARD, A. et al. Contamination by *Salmonella* spp ., *Campylobacter* spp . and *Listeria* spp . of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. **International Journal of Food Microbiology**, v. 250, p. 68–74, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.017>>.

VAN ASSELT, E. D. et al. Food Safety Crisis Management—A Comparison between Germany and the Netherlands. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 2, p. 477–483, 2017. VÁZQUEZ, E. G. et al. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia* **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70777-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70777-2)>.

VÁZQUEZ, E. G. et al. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia* **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70777-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70777-2)>.

WAGHAMARE, R. N. et al. Phenotypic and genotypic drug resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from poultry farm and processing units located in and around Mumbai city , **India, Veterinary World**, 11(12): 1682-1688, 2018.

WINDHORST, D. et al. the poultry farm environment **Immunology & Medical Microbiology**. v. 65, p. 360–365, 2012.

YAMATOGLI, R. S. et al. *Salmonella* spp. in poultry carcass: evaluation of sample preparation methods and effect of storage under refrigeration on pathogen recovery. **Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 50-53, 2012

YAMATOGLI, R. S. et al. Qualitative and Quantitative Determination and Resistance Patterns of *Salmonella* from Poultry Carcasses. **Journal of Food Protection** Vol. 79, No. 6, pp. 950-955, 2016.

YIN, Y.; ZHOU, D. Organoid and Enteroid Modeling of *Salmonella* Infection, **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Vol.8, pp.102, April, 2018.

YOON, Y. et al. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016. <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>>