

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ELFA ELISA UTILIZANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE DE BACTERÍOFAGO E OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

(Comparative analysis between ELFA ELISA using a recombinant bacteriophage protein and other diagnostic methods for *Salmonella* spp. detection in products of animal origin)

Felipe Gava^a, Paula Wildemann^a, Danielle Gava^b, Sandra Maria Ferraz^a, Roberto Degenhardt^c, Eliana Knackfuss Vaz^{a1}

¹Correspondência: eliana.vaz@udesc.br

^a – Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, Centro de Diagnostico Microbiológico Animal – CEDIMA, Lages, SC, Brasil

^b – EMBRAPA Suínos e Aves, Complexo de Sanidade Animal, Concórdia, Lages, SC, Brasil

^c – Brasil Foods – BRF, Capinzal, SC, Brasil

RESUMO: Os métodos de análise para detecção de *Salmonella* spp. são de grande importância no processo da agroindústria de produtos de origem animal, pois refletem diretamente na qualidade microbiológica dos alimentos, impactando no tempo de estocagem e por conseguinte na liberação do produto para a venda. Este estudo verificou a eficiência de um novo teste ELFA ELISA utilizando uma proteína recombinante oriunda de bacteriófago (VIDAS UP®) para detectar a presença de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal. Foram analisadas 215 amostras (15 amostras artificialmente contaminadas e 200 amostras de rotina da agroindústria), de diferentes produtos de origem animal. As amostras foram submetidas a cinco métodos de diagnóstico: VIDAS UP®, metodologia convencional de acordo com ISO 6579, reação em cadeia da polimerase (PCR), meio semissólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) e meio MSR + suplemento. Onze amostras das 215 (5,12%) foram positivas em pelo menos um dos testes, sendo quatro amostras de rotina da agroindústria e sete amostras artificialmente contaminadas. A sensibilidade e especificidade do teste VIDAS UP® em relação à metodologia convencional foi de 90,0% e 99,51%, respectivamente. O teste VIDAS UP® apresentou equivalência com as demais metodologias, mostrando-se eficaz e rápido na detecção de *Salmonella* spp. em diferentes produtos de origem animal.

Palavras-chave: Alimentos; bacteriófago; ELFA ELISA; *Salmonella* spp.; VIDAS UP®

ABSTRACT: The analysis methods for *Salmonella* spp. detection are of great importance in the system of animal products processing industries, because they reflect directly on the microbiological quality of food, impacting the storage time and therefore the release of the product for sale. This study verified the efficiency of a new ELFA ELISA test using a recombinant protein from bacteriophage (VIDAS UP®) to detect the presence of *Salmonella* spp. in products of animal origin. Two hundred fifteen samples (15 samples artificially contaminated and 200 samples from agribusiness routine), from different products of animal origin were analyzed. The samples were tested by five methods of diagnosis: VIDAS UP®, conventional methodology in accordance with ISO 6579, polymerase chain reaction (PCR), semi-solid Rappaport-Vassiliadis Modified (MSRV) and MSR + supplement. Eleven out of 215 (5.12%) samples were positive in at least one test, which four samples were from agribusiness routine and seven were from artificially contaminated samples. The sensitivity and specificity of the VIDAS UP® when compared with the conventional method was 90.0% and 99.51% respectively. The VIDAS UP® was equivalent to the other methodologies, showing to be an effective and a rapid method to detect *Salmonella* spp. in different products of animal origin.

Key Words: Bacteriophage; ELFA ELISA; food; *Salmonella* spp.; VIDAS UP®

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a *Salmonella* spp. tem sido um dos principais agentes relacionados a surtos de toxinfecção em humanos (WEGENER e BAGER, 1997; WHO, 2007; EFSA, 2013). A salmonelose humana ocorre, principalmente, devido ao consumo de alimentos e água contaminados com este patógeno. Vários alimentos já foram associados a esta infecção, como derivados de carne e subprodutos de origem avícola e suína (MEYER *et al.*, 2010; TEMELLI *et al.*, 2012; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012). A *Salmonella* spp. coloniza o trato gastrointestinal de diferentes espécies animais, muitas vezes sem produzir nenhum sinal clínico ou lesão (WRAY e WRAY, 2000). Todavia, a carcaça pode ser contaminada no momento do abate, tornando a detecção de *Salmonella* spp. nos produtos cárneos e derivados de suma importância (BOTTELDOORN *et al.*, 2003; REITER *et al.*, 2007).

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos compreende etapas de cultura dispendiosas e trabalhosas, necessitando de três a cinco dias para confirmação do resultado (WRAY e WRAY, 2000; WHO, 2007). Para a indústria de alimentos, que retêm seus produtos até a obtenção dos resultados analíticos frente a um patógeno pesquisado, este tempo implica em perdas econômicas. Desta forma, o uso de metodologias de diagnóstico de *Salmonella* spp. de rápida detecção, simples e confiáveis, são imprescindíveis tanto em monitoria da produção animal, fabricação de alimentos e produto final, como para o diagnóstico de toxinfecções alimentares.

Diferentes técnicas de diagnóstico de *Salmonella* spp. vem sendo estudadas e analisadas em relação a especificidade e sensibilidade.

Dentre os testes, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), cultivo em meio semissólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (MSRV), ELISA, ELFA-ELISA (VIDAS® - Biomerieux), bem como um teste ELFA ELISA utilizando uma proteína recombinante oriunda de um bacteriófago (VIDAS UP® - Biomerieux) (FLOWERS *et al.*, 1989; BEUMER *et al.*, 1991; FRANCHIN *et al.*, 2006; BOHAYCHUK *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2008; MEYER *et al.*, 2010). Neste estudo foi avaliada a metodologia VIDAS UP® frente aos métodos já consagrados de detecção, em produtos de origem animal e do processamento da agroindústria.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram analisadas 215 amostras (15 amostras artificialmente contaminadas e 200 amostras de rotina da agroindústria), de 21 diferentes produtos de origem animal (Tabela 1). Destes 21 produtos, 52,38% (11/21) eram de origem avícola, 28,57% (6/21) eram oriundos de suínos e 19,05% (4/21) eram provenientes de produtos do processo fabril. As amostras avaliadas foram selecionadas aleatoriamente, de acordo com o fluxo da rotina laboratorial, originárias de três diferentes unidades fabris do estado de Santa Catarina.

Tabela 1- Descrição da origem das amostras testadas para *Salmonella* spp., relacionando número de amostras positivas detectadas pelo método VIDAS UP® com o número total amostras avaliadas.

| AMOSTRAS | Nº de positivas / nº total de amostras |
|-------------------------------------|--|
| Água de chiller | 0/9 |
| Swab de ambiente | 0/1 |
| Amostra artificialmente contaminada | 7/15 |
| Carcaça de frango | 1/21 |
| Carne de frango "in natura" | 0/43 |
| Carne moída de frango | 0/10 |
| Carne suína "in natura" | 0/14 |
| CMS de frango | 1/8 |
| Condimento | 0/1 |
| Estômago de suíno | 0/1 |
| Farinha de pena | 0/4 |
| Farinha de vísceras | 0/1 |
| Gema | 0/1 |
| Gordura de aves | 0/4 |
| Gordura suína | 0/1 |
| Industrializado de aves cozido | 0/60 |
| Industrializado de aves cru | 1/7 |
| Industrializado de suíno cozido | 0/5 |
| Industrializado de suíno cru | 0/3 |
| Míudo de aves | 0/4 |
| Pele de aves | 0/1 |
| Tripa suína | 0/1 |
| TOTAL | 10/215 |

A inclusão do grupo controle objetivou a obtenção de um maior número de amostras positivas a fim de possibilitar uma maior confiabilidade na avaliação da sensibilidade na detecção de *Salmonella* spp. pelo método VIDAS UP®. Para isto, três amostras de carne mecanicamente separada (CMS) de frango (identificadas como #719, 720 e 721), sabidamente negativas para *Salmonella* spp., foram artificialmente contaminadas. A cepa padrão de *S. typhimurium* (ATCC 14028) foi diluída em cinco diluições em base 10 (10-6, 10-8, 10-10, 10-12 e 10-14) e adicionada ao CMS separadamente. Após, cada amostra de CMS, contendo uma das cinco diluições de *S. typhimurium* foi testada em triplicata. Para quantificar o número de células bacterianas viáveis nas diferentes diluições, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para isso, 1mL de cada diluição foi inoculado em placas Petrifilm® (3M). A diluição 10-6 apresentou incontáveis números de células; a diluição 10-8 teve em torno de 60 UFC/mL; e a diluição 10-

10 mostrou apenas 1 UFC/mL em somente uma das três placas avaliadas; ausência de crescimento foi verificado nas demais diluições. Desta forma, somente as diluições que apresentaram crescimento, foram testadas pelos cinco diferentes métodos de diagnóstico.

2.2 Análises laboratoriais para *Salmonella* spp.

Todas as 215 amostras foram testadas por cinco métodos de diagnóstico: VIDAS UP®, metodologia convencional de acordo com ISO 6579, PCR, meio MSR/V e meio MSR/V + suplemento.

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas e 50±0,5g do produto foram pesados e subdivididos em duas partes de 25±0,5g, utilizando o equipamento Dilumat 4® (AES - Biomerieux). Uma das partes da amostra foi pré-enriquecida em 225mL de água peptonada tamponada (BPW), seguido por incubação a 37°C por 24 horas, a qual foi destinada para teste com a metodologia convencional de acordo com ISO 6579, PCR e meio MSR/V. A outra parte da amostra foi submetida ao mesmo procedimento, porém foi adicionado suplemento seletivo (SPT® - Biomerieux) a fim de favorecer o crescimento de *Salmonella* spp. frente à outros micro-organismos competidores. A amostra foi incubada a 41,5°C por 18 horas, sendo após, destinada ao teste VIDAS UP® e ao teste MSR/V + suplemento.

2.3 Metodologia convencional de acordo com ISO 6579

Este método foi realizado de acordo com a norma da ISO (International Organization for Standardization) 6579 para alimentos cárneos. Após o pré-enriquecimento, foi realizado enriquecimento seletivo em dois diferentes caldos, um utilizando 0,1mL do caldo de pré-enriquecimento em 9,9mL de caldo Rappaport-

Vassiliadis Soja (RVS) a 41,5°C por 24 horas e outro utilizando 1mL do caldo de pré-enriquecimento em 9mL de caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn) a 37°C por 24 horas. A partir dos caldos RVS e MKTTn foi feito plaqueamento em meio ágar XLD e em ágar verde brilhante e as placas incubadas a 37°C por 24 até 48 horas. A confirmação ocorre pela observação do crescimento de colônias bacterianas as quais apresentam coloração preta.

2.4 ELFA ELISA utilizando proteína recombinante de bacteriófago

O teste foi realizado utilizando o kit VIDAS UP® (Biomerieux), seguindo recomendações do fabricante. Após o pré-enriquecimento, uma alíquota de 0,5 mL da amostra enriquecida foi colocada no dispositivo Heat and Go® (Biomerieux) e incubada a 132°C por cinco minutos, para melhor exposição da membrana externa bacteriana e para facilitar a aderência às proteínas oriundas de fagos específicos para *Salmonella* spp., presentes no kit. Após, a amostra foi transferida para o equipamento VIDAS® (Biomerieux), a 37°C por aproximadamente 48 minutos, onde foi realizado o teste qualitativo para *Salmonella* spp.

2.5 MSRV e MSRV + suplemento

Este método foi realizado de acordo com o descrito por De Smedt et al. (1986) e Franchin et al. (2006) utilizando o meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (Acumedia 7511) acrescido de 1mL de novobiocina a 2% (Inlab 5701). As placas de Petri com o ágar foram incubadas a 42°C por 24 horas. Aquelas que apresentaram halo de migração visível foram plaqueadas em meio ágar XLD e em ágar verde brilhante e incubadas a 37°C por 24 horas. A confirmação de *Salmonella* spp. deu-se da mesma forma conforme

descrito para a metodologia convencional de acordo com ISO 6579.

2.6 Reação em Cadeia de Polimerase - PCR

O teste foi realizado utilizando o sistema automatizado BAX® *Salmonella* System (Du Pont), seguindo recomendações do fabricante.

2.7 Análise estatística

A sensibilidade e especificidade dos diferentes testes diagnósticos foram avaliadas utilizando o procedimento FREQ do programa SAS (SAS, 2008). As quatro diferentes metodologias testadas: VIDAS UP®, reação em cadeia da polimerase (PCR), meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) e meio MSRV + suplemento foram comparadas frente a metodologia convencional de acordo com a ISO 6579, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho relata a primeira comparação do teste VIDAS UP® com metodologias já estabelecidas para detecção de *Salmonella* spp., em diferentes produtos de origem animal, no Brasil. Das 215 amostras avaliadas, 10 (4,65%) foram positivas para *Salmonella* spp. pela metodologia VIDAS UP® (Tabela 1). Ao avaliar somente as amostras artificialmente contaminadas, sete das 15 (46,66%) foram positivas através desta metodologia. Das 200 amostras de produtos de origem animal e do processamento da agroindústria testadas, somente três amostras foram positivas (1,5%), sendo uma amostra de industrializado de ave cru, uma de carcaça de frango e uma de carne mecanicamente separada de frango (CMS) (Tabela 1 e 2).

Tabela 2- Amostras positivas para *Salmonella* spp. testadas pelas metodologias convencional, VIDAS UP®, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento.

| Identificação da amostra | Produto | Metodologia | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------|----------|----------|-------------------|
| | | Tradicional | VIDAS UP® | PCR | MSRV | MSRV + Suplemento |
| 562 | Carcaça de Frango | Negativo | + | + | Negativo | + |
| 2575590 | Industrializado Ave Cru | + | + | + | Negativo | Negativo |
| 01T | Carne Moída Frango | + | Negativo | Negativo | + | Negativo |
| 11T | CMS de frango | + | + | + | + | + |
| 719 - Diluída 10 ⁶ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 720 - Diluída 10 ⁶ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 721 - Diluída 10 ⁶ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 719 - Diluída 10 ⁸ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 720 - Diluída 10 ⁸ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 721 - Diluída 10 ⁸ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 721 - Diluída 10 ⁸ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |
| 721 - Diluída 10 ⁸ | Artificialmente contaminada | + | + | + | + | + |

A avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos, quando comparados com a metodologia convencional estão evidenciados na Tabela 3. Uma amostra (carcaça de frango), não foi positiva na metodologia convencional, mas foi positiva em outros métodos. Já outra amostra (carne moída de frango), que foi positiva na metodologia convencional, positivou apenas no meio MSRV. Oito das onze amostras foram positivas em todas as metodologias analisadas (Tabela 2), demonstrando alta correlação entre os métodos.

Tabela 3- Determinação da sensibilidade e especificidade das metodologias VIDAS UP®, PCR, MSRV e MSRV + Suplemento em comparação com a metodologia convencional, utilizando o procedimento FREQ (SAS).

| | Metodologia | | | |
|--------------------|-------------|------|------|-------------------|
| | VIDAS UP® | PCR | MSRV | MSRV + Suplemento |
| Sensibilidade (%) | 90,0 | 90,0 | 100 | 88,8 |
| Especificidade (%) | 99,5 | 99,5 | 99,5 | 99,0 |

Vários estudos compararam o teste ELFA ELISA (VIDAS®) com outras metodologias para detecção de *Salmonella* spp. e observaram resultados semelhantes entre elas. O VIDAS® é um teste automatizado, baseado na reação de antígeno-anticorpo, para detecção de *Salmonella* spp.. De Medici *et al.* (1998) e McMahon *et al.* (2004) indicaram grande concordância entre o ELFA ELISA e a metodologia convencional. Já Reiter *et al.* (2007) encontraram maior percentual de amostras positivas no ELFA ELISA do que na metodologia convencional. Uyttendaele *et al.* (2003), ao avaliarem

produtos de origem aviária, comparando a metodologia convencional com ELFA ELISA e PCR, encontraram amostras falso positivas e falso negativas nos dois métodos. Ao comparar o sistema VIDAS® com PCR, o ELFA ELISA mostrou-se mais sensível. Os testes também foram mais sensíveis ao detectar amostras artificialmente que naturalmente contaminadas. Uma explicação para estes achados deve-se a presença de *Salmonella* spp. em contagens abaixo do limite de detecção do ELFA ELISA (<90 UFC/mL) mas no limite de detecção do isolamento convencional (9 a <90 UFC/mL). Outra possível razão para esta diferença é que as células bacterianas podem ter sido danificadas pelo frio ou calor, ou que não tenham sido recuperadas pelas etapas de enriquecimento (UYTTENDAELE *et al.*, 2003; FAKHR *et al.*, 2006; JASSON *et al.*, 2011).

Resultados semelhantes para a detecção de *Salmonella* spp., utilizando a metodologia VIDAS UP® ou a PCR foram obtidas neste estudo. Quando comparadas com a metodologia convencional, ambas as técnicas apresentaram 90% de sensibilidade. Contudo, resultados falsos positivos na PCR já foram observados em outros estudos (FAKHR *et al.*, 2006; O'REGAN *et al.*, 2008; BOHAYCHUK *et al.*, 2007; EYIGOR *et al.*, 2010). Além disto, a sensibilidade da PCR também pode ser afetada devido à presença de substâncias inibitórias bem como falsos positivos podem ocorrer, pois o método é baseado na amplificação de material genético, que pode ser de bactéria morta, não cultivável ou degradada (WILSON, 1997; UYTTENDAELE *et al.*, 2003).

A metodologia MSRV detecta somente *Salmonella* spp. móvel. Apesar de existir menos de 0,1% de *Salmonella* spp. imóvel, resultados falso negativos podem ocorrer (OGGEL *et al.*, 1990). A detecção de amostras positivas pelo

PCR, mas não pelo MSR/V, novamente pode ser explicado também pelo fato de que o DNA está presente em células mortas e pode ser amplificado por PCR, não diferenciando *Salmonella* spp. viável de não viável (WILSON, 1997).

O fato de uma amostra ser negativa nos testes VIDAS UP®, PCR e MSR/V + suplemento, mas positiva na metodologia convencional, fez com que a sensibilidade dos testes anteriormente citados fosse reduzida, quando comparados com a metodologia convencional. Outro fator que pode ter influenciado na sensibilidade dos testes foi o baixo número de amostras positivas, mesmo utilizando amostras artificialmente contaminadas. Não houve diferença entre os testes com relação à especificidade. Por sua vez, um estudo conduzido por Bird et al., (2013), demonstrou sensibilidade semelhante entre VIDAS UP® e metodologia convencional, tanto para amostras de 25g ou 375g.

Neste estudo, foi determinado que a metodologia VIDAS UP® foi altamente sensível e específica na detecção de *Salmonella* spp., demonstrando que o método possui equivalência com outros métodos consagrados de análise. Este teste é rápido e pode ser usado no screening de amostras de produtos de origem animal para detecção de *Salmonella* spp.. A principal vantagem deste método, quando comparado com os demais, é a rapidez e praticidade na obtenção do diagnóstico, levando horas, ao invés de dias ou semanas, o que diminui os custos em frigoríficos, principalmente os relacionados à estocagem, além da facilidade de execução de seu protocolo facilitando a rotina laboratorial.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi determinado que a metodologia VIDAS UP® foi altamente

sensível e específica na detecção de *Salmonella* spp. em produtos de origem animal e do processamento da agroindústria, demonstrando que o método possui equivalência com outros métodos consagrados de análise.

AGRADECIMENTOS

A Biomerieux® pelo suporte financeiro. À empresa BRF - Brasil Foods que permitiu a realização do experimento.

REFERÊNCIAS

- BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* sp: a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, n.4, p.363-374, 1991.
- BIRD, P.; FISHER, K.; BOYLE, M.; HUFFMAN, T.; JUENGER, M.; BENZINGER, M.J. Jr.; BEDINGHAUS, P.; FLANNERY, J.; CROWLEY, E.; AGIN, J.; GOINS, D.; JOHNSON, R.L. Evaluation of VIDAS UP *Salmonella* (SPT) assay for the detection of *Salmonella* in a variety of foods and environmental samples: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.96, n.4, p.808-821, 2013.
- BOHAYCHUK, V.M.; GENSLER, G.E.; McFALL, M.E. 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 Protection**, v.70, n.5, p.1080-1087, 2007.
- BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJPENS, N. GRIJSPEERDT, K.; HENNAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Applied Microbiology**, v.95, n.5, p.891-903, 2003.

- DE MEDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C. et al. Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.45, n.3, p.205-210, 1998.
- DE SMEDT, J.M.; BOLDERDIJK, R.F.; RAPPOLD, H. et al. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium. **Journal of Food Protection**, v.49, n.7, p.510-514, 1986.
- EFSA. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v.11, n.4, p.3129, 2013.
- EYIGOR, A.; TEMELLI, S.; CARLI, K.T. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM methods to complement real-time polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry meat and red meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.8, p.921-927, 2010.
- FAKHR, M.K.; MCEVOY, J.M.; SHERWOOD, J.S. et al. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, n.1, p.78-83, 2006.
- FLOWERS, R.S.; KLATT, M.J.; KEELAN, S.L. et al. Fluorescent enzyme immunoassay for rapid screening of *Salmonella* in foods: collaborative study **Journal of AOAC International**, v.72, n.2, p.318-325, 1989.
- FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; ANDRADE, D.F. et al. Comparison of the BAX® system with an in-house MSR/V method for the detection of *salmonella* in chicken carcasses and pork meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.521-526, 2006.
- HAGENS, S. e LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, n.3, p.513-519, 2007.
- ISO, EN ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2002. Disponível em: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=29315 Acesso em: 14 de setembro de 2015.
- JASSON, V.; BAERT, L.; UYTENDAELE, M. Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.2-3, p.488-491, 2011.
- MEYER, C.; THIEL, S.; ULLRICH, U.; STOLLE, A. *Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef. **Journal of Food Protection**, v.73, n.10, p.1780-1784, 2010.
- McMAHON, W.A.; SCHULTZ, A.M.; JOHNSON, R.L. Evaluation of VIDAS *Salmonella* (SLM) immunoassay method with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.87, n.4, p.867-883, 2004.
- OGGEL, J.J.; NUNDY, D.C.; RANDALL, C.J. Modified 1-2 Test system as a rapid screening method for the detection of *Salmonella* in foods and feeds. **Journal of Food Protection**, v.53, n.8, p.656-658, 1990.
- O'REGAN, E.; McCABE, E.; BURGESS, C. et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken

samples. **BMC Microbiology**, v.8, n.156, p.1-11, 2008.

PÉREZ, C.M.; SÁNCHEZ, M.M.; HENAO, S. et al. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie enterica en huevos.

Archivos de Medicina Veterinária, v.40, p.235-242, 2008.

REITER, M.G.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G. et al. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1723-1725, 2007.

SAS, 2005. SAS/STAT User's Guide, Release 6.12 SAS Institute INC ed, Cary, NC.

SOUSA, M.F.P.; SOARES, C.O.; CARRIJO, A.S. *Salmonella* sp. em avicultura industrial: diagnóstico imunológico e molecular. **Higiene Alimentar**, v.21, n.153, p.53-58, 2007.

TEMELLI, S.; EYIGOR, A.; CARLI, K.T. *Salmonella* detection in poultry meat and meat products by the Vitek immunodiagnostic assay system easy *Salmonella* method, a LightCycler polymerase chain reaction system, and the International Organization for Standardization method 6579. **Poultry Science**, v.91, n.3, p.724-731, 2012.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>

UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, n.5, p.386-391, 2003.

WEGENER, H.C e BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis In: In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 1997.

Proceedings... Copenhagen, p.3-8. 1997.

WHO. World Health Organization. Food safety and foodborne illness. 2007.

Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/> Acesso em: 27 de maio de 2012.

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

WRAY, C. e WRAY, A. ***Salmonella* in Domestic Animals**. Oxon, United Kingdom: CABI Publishing; 2000. 462p.