

# Detecção de *Salmonella* spp por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em ovos comercializados em Fortaleza, Ceará

Detection of *Salmonella* spp through polymerase chain reaction (PCR) on eggs commercialized in Fortaleza, Ceará

1. Camila Gonçalves Monteiro **Carvalho**
  2. Maria Izabel Florindo **Guedes**
  3. Iara de Lima **Baia**
  4. Sérgio Marcelo Rodríguez **Málaga**
  5. Tatiane Rodrigues de **Oliveira**
1. Graduada em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará.
  2. Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Fitotecnia pela UFC. Graduada em Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo.
  3. Especialista em Biologia Molecular pela Universidade Estadual do Ceará (UECE). Graduada em Ciências Biológicas pela UECE.
  4. Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo. Mestre em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo. Graduado em Tecnologia Médica pela Universidade de Antofagasta (Chile).
  5. Doutora em Farmácia pela Universidade de São Paulo. Mestre em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo. Graduada em Ciências Biológicas pela Mackenzie.

## Correspondência para:

 tatianerroliveira@gmail.com

 R. Mariana Furtado Leite, 1240, Fortaleza-CE.

## RESUMO

O ovo é um alimento econômico e de alto valor nutritivo que faz parte do hábito alimentar do povo brasileiro. Entretanto, é um dos principais agentes causadores de salmonelose, enfermidade provocada por bactérias do gênero *Salmonella*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, sendo conhecidos mais de 2.500 sorotipos, dos quais 80 a 90 têm importância para a saúde de animais e seres humanos. Diante dessa problemática, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o nível de contaminação por *Salmonella* spp. em ovos de galinha e codorna (casca e gema) comercializados em Fortaleza/CE, por meio da técnica de PCR. Foram analisadas amostras de casca e gema de 36 ovos dos tipos branco, vermelho e codorna por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos que conseguem amplificar um fragmento de 284 pares de bases (bp) do gene *invA* de *Salmonella* *thyfimurium*. Os resultados mostram que 2,6% da parte interna dos ovos e 5,3% da casca foram positivos para salmonela. Na comparação entre os diferentes tipos de ovos, das 18 amostras de ovos brancos, 11,1% apresentaram positividade na casca para *Salmonella*; das 14 de ovos de codorna, cerca de 7,1% das gemas apresentavam-se positivas e os ovos vermelhos apresentaram ausência de contaminação. Conclui-se que a técnica de PCR foi eficiente para demonstrar que ovos de galinha e codorna comercializados na cidade de Fortaleza-CE apresentaram contaminação por salmonela. Notificação: apoio financeiro CAPES e CNPQ.

**Palavras-chave:** ovos, salmonela, reação em cadeia da polimerase, PCR.

## ABSTRACT

The egg is an inexpensive and highly nutritious food that is part of the Brazilian food habits. However, eggs are one of the most important causative agents of salmonellosis, diseases caused by bacteria of the genus *Salmonella*, belonging to the family Enterobacteriaceae, of which there are more than 2,500 serotypes; however, 80-90 are important to the health of animals and humans. Therefore, the aim of this study was to evaluate the level of contamination by *Salmonella* spp. in quail and chicken eggs (shell and yolk) commercialized in Fortaleza/CE by a specific polymerase chain reaction (PCR). The shell and yolk of 36 egg were analyzed by PCR using specific primers that amplify a fragment of 284 base pairs (bp) from the *invA* gene of *Salmonella* *thyfimurium*. The results show that 2.6% of the yolks and 5.3% shells were positive for *Salmonella*. Comparing the different types of eggs, 11.1% of the white type were positive in shell for *Salmonella*, 7.1% of the yolk from quail eggs were positives and no contamination was detected in red eggs. In conclusion, the PCR was effective to demonstrate that chicken and quail eggs sold in Fortaleza-CE showed salmonella contamination. This study received financial support from CAPES and CNPQ.

**Keywords:** eggs, salmonella, polymerase chain reaction, PCR.

## INTRODUÇÃO

Ovo é um alimento econômico, nutritivo, fonte de proteínas de alto valor biológico, que se tornou hábito alimentar na mesa do povo brasileiro (ARAÚJO, 2012). Devido à excelente qualidade proteica, ele pode ser substituído de outros alimentos ricos em proteínas de alto valor biológico, como carnes vermelhas e frangos, possuindo, além disso, todos os aminoácidos essenciais para uma dieta equilibrada. Segundo a União Brasileira de Avicultura, o consumo nacional por habitantes é de 168,72 unidades per capita/ano. O Ceará é responsável por 3,84% da produção nacional de ovos, sendo que 99% dela são destinados ao mercado interno (UBABEF, 2013).

O ovo é também uma excelente fonte de importantes nutrientes, como: vitaminas (riboflavina, vitamina E, vitamina B6, vitamina A, ácido fólico, colina, vitamina K, vitamina D e vitamina B12) e minerais (zinco, cálcio, selênio, fósforo e ferro); apresenta grandes benefícios para os olhos, devido ao conteúdo de carotenoides, especialmente a luteína e a zeaxantina, sendo uma das principais fontes de colina, um nutriente que ajuda a regular o cérebro, o sistema nervoso e o sistema cardiovascular (ARAÚJO, 2012).

Entretanto, é considerado um dos principais alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e um dos principais agentes causadores da salmonelose, causada pela bactéria cosmopolita do gênero *Salmonella spp.*, que é considerada um problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo o gênero bacteriano mais estudado microbiologicamente (SALLES *et al.*, 2008). Somente no Brasil, de 2000 a 2013, a salmonela foi responsável por 1.525 notificações de surtos de DTA. Desse total, 12% foram registrados na região Nordeste. Ovos e produtos à base de ovos foram o segundo tipo de alimento mais envolvido em surtos, responsável por 806 notificações de DTA em todo o País (BRASIL, 2013).

O gênero *Salmonella* é membro da família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, intracelulares, anaeróbios facultativos, predominantemente móveis, com exceção dos sorotipos *S. pullorum* e à *S. gallinarum*. Fermentam glicose, mas não lactose e sacarose, geralmente produzindo ácido, gás e H<sub>2</sub>S, reações químicas importantes para a caracterização do gênero e diferenciação dos biótipos. As condições ideais para a multiplicação desse microrganismo são pH em torno de 7,0, temperatura de 35-37°C e concentrações de sal abaixo de 9% (OLIVEIRA; TAHAM, 2011).

A salmonela possui grande número de genes que são determinantes na manutenção da doença. Alguns são codificados por um grande agrupamento conhecido como “*Salmonella Pathogenicity Islands*” (SPI). Até o momento, das 21 SPIs conhecidas, a SPI-1, que abriga os genes para o sistema de secreção tipo III (T3SS1), importante para a invasão de células não fagocíticas, tais como células M no lúmen intestinal e ativação da resposta pró-inflamatória, e SPI-2, necessária para a replicação das células bacterianas

efetoras no citosol da célula hospedeira, são as mais estudadas. Dentro do grupo de genes pertencentes ao SPI-1, o *operon* (*invA*, *invB* e *invC*) transcreve 3 genes relacionados, os quais são fundamentais para o início de invasão das células epiteliais do hospedeiro (JONG *et al.*, 2012).

A principal rota de entrada da salmonela em humanos e animais é por meio da ingestão de alimentos contaminados, principalmente carne e ovos ou infecção feco-oral. No homem, as bactérias colonizam o trato intestinal e, após penetrarem na barreira epitelial, infectam fagócitos dentro da lamina própria, produzindo, assim, uma resposta inflamatória com liberação de prostaglandinas e estimuladores de adenilciclase. Esse processo acarreta um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando os quadros entéricos, caracterizado por um período de incubação de 8 a 48 horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo os sintomas mais comuns da infecção dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e febre (BARDAQUIM; RODRIGUES; SOUSA, 2011).

O processo de detecção convencional de salmonela em ovos e outros alimentos envolve etapas de enriquecimento em meios de cultivo seletivo e diferenciais para posterior identificação de sorogrupos e sorotipos por métodos bioquímicos. Por ser uma técnica demorada e trabalhosa, isso dificulta o monitoramento da cadeia de produção e a adoção de medidas de controle para a liberação de lotes que estejam contaminados (RISSATO *et al.*, 2011).

Com isso, a necessidade de medidas imediatas no controle da salmonelose tornou a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) uma poderosa ferramenta no diagnóstico microbiológico. A PCR tem se consolidado como uma técnica de identificação que representa um grande avanço em termos de velocidade, sensibilidade e especificidade em relação aos métodos de diagnóstico vigentes, como o bacteriológico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o nível de contaminação por *Salmonella spp.* em ovos de galinha e codorna comercializados em Fortaleza/CE, por meio da técnica de PCR.

## METODOLOGIA

Nesta pesquisa, realizou-se um estudo experimental de abordagem quantitativa em que a análise molecular da qualidade sanitária dos ovos das espécies *Gallus gallus domesticus* (galinha) e *Coturnix japonica* (codorna) foi realizada no Laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará, no período de janeiro a dezembro de 2014.

## Coleta de amostras

As amostras foram coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais da cidade de Fortaleza e transportadas nas embalagens originais, sem refrigeração. Foram avaliados o conteúdo interno (gema) e a casca de 24 ovos dos tipos branco e vermelho, classificados segundo a comercialização (grande, trincado e sujo)

e 14 ovos de codorna, conforme descrito na Tabela 1. Os critérios de exclusão foram a aquisição de ovos fora da validade e com embalagens danificadas.

| Tipos    | Grande | Trincado | Sujo   | TOTAL   |
|----------|--------|----------|--------|---------|
| Branco   | 6 unid | 6 unid   | 6 unid | 18 unid |
| Vermelho | 6 unid | 0        | 0      | 6 unid  |
| Codorna  | n.a    | n.a      | n.a    | 14 unid |

**Tabela 1:** Quantidade de ovos analisados segundo o tipo e a classificação comercial.  
unid: (unidades)  
n.a: (não se aplica)

## Cultivos bacterianos e extração do DNA genômico

O preparo das amostras consistiu na separação da gema e da casca, que foram quebradas e homogeneizadas separadamente em placa de Petri estéril. A alíquota de 1ml de gema e o 1g de casca macerada foram transferidos para tubos plásticos de centrifuga estéreis contendo 9ml de caldo Luria Bertani (LB) (diluição 1:10) e incubados a 37°C por 48 horas.

As cepas-padrão de *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizadas no ensaio de especificidade foram gentilmente cedidas pela Fiocruz (RJ) e submetidas ao mesmo método de cultivo descrito acima. O protocolo de extração de DNA genômico utilizando fenol/clorofórmio foi realizado segundo Hartl e Jones (2000).

## Amplificação do gene *invA* para identificação de *Salmonella spp*

As reações de PCR para amplificação do fragmento de 284 pares de bases (bp) do gene *invA* de *Salmonella thymurium* foram realizadas em um volume de 25 µl contendo 1 µl de DNA genômico, 1x do tampão de PCR, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 100 µM de dNTP mix e 2.5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram: 94°C/ 5 min, seguido por 35 ciclos de 30s a 94 °C, 40s a 60°C, 30s a 72° C e um ciclo de extensão final de 10 min a 72° C. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% contendo GelRed e visualizados no transiluminador Spectroline Serie Standard.

|        |                                    |
|--------|------------------------------------|
| Salm 1 | 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGCGCAA-3' |
| Salm 2 | 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'       |

**Tabela 2:** Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *invA*. Fonte: Rahn et al. (1992).

A especificidade dos oligonucleotídeos foi testada por PCR utilizando os parâmetros mencionados acima e DNA genômico extraído de bactérias não relacionadas, tais como: *S. aureus* e *E. coli*.

## Análise dos dados

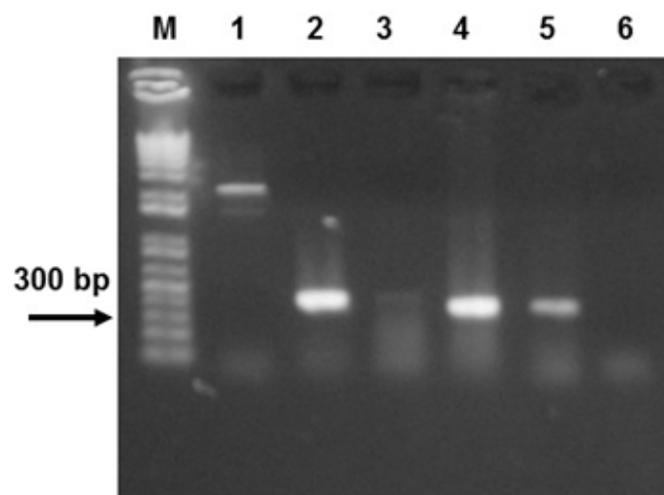
Empregou-se o teste não paramétrico do qui-quadrado, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), conforme descrito por Greenwood e Nikulin (1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos analíticos para pesquisa de salmonela em ovos e outros produtos definem como sendo o diagnóstico bacteriológico de isolamento e identificação do agente a técnica oficial recomendada (BRASIL, 1993), porém muitas pesquisas têm sido realizadas visando introduzir metodologias rápidas e sensíveis, como: testes de imunocaptura (IMS), amplificação do DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) ou por biossensores, pela agilidade que o mercado atual exige.

Entre as técnicas moleculares disponíveis, a amplificação do DNA por PCR tem sido a técnica de maior aceitação devido à sua alta sensibilidade e à especificidade, sendo empregada como uma ferramenta de diagnóstico para detecção de *Salmonella spp* em ovos e outros produtos (FALD; NGUYEN; KHAN, 1995).

Neste estudo, a especificidade do ensaio de PCR foi inicialmente testada utilizando DNA genômico de cepas-padrão de *Salmonella spp* e de duas bactérias não relacionadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), extraídos pela técnica de fenol-clorofórmio e amplificados com os oligonucleotídeos do gene *invA*. Como demonstrado na Figura 1, o ensaio de PCR foi capaz de amplificar uma única banda correspondente a 284 pb para as cepas de *Salmonella* em amostra de ovo e um fragmento inespecífico de peso molecular superior na amostra de DNA genômico da cepa *E. coli*, não sendo detectada amplificação no controle negativo.



**Figura 1:** Especificidade do ensaio de PCR para amplificação do gene *invA* em diferentes cepas bacterianas. Os produtos amplificados com os oligonucleotídeos específicos para *Salmonella spp* foram analisados em gel de agarose 1,5% e visualizados em transiluminador UV. M: padrão de peso molecular; 1: amostra contendo DNA template de *E. coli*; 2 e 4: amostras contendo DNA template de *Salmonella spp* (controles positivos); 3: amostra contendo DNA template de *S. aureus*; 5: amostra de ovo positivo para *Salmonella spp*; e 6: controle negativo (sem DNA template na reação).

Rahn *et al.* (1992), utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos do gene *invA*, detectaram 626 cepas de *Salmonella* das 630 testadas, a partir de colônia isolada e incorporada direto na PCR, obtendo uma sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%. A amplificação de bandas inespecíficas em microrganismos não relacionados vem sendo demonstrada na literatura. Dados de Santos *et al.* (2001) corroboram nossos achados, pois, avaliando a especificidade e a sensibilidade dos oligonucleotídeos (primers) 159 (5'GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA3') e 141 (5'TCATCGCACACGTCAAAGGACC3') derivados do gene *invA*, foi detectado em nove culturas-padrão de salmonela um fragmento de aproximadamente 284 pb e amplificação inespecífica na amostra de DNA de *E. coli*.

A literatura estabelece como resultado positivo para PCR de salmonela a amplificação de fragmentos de DNA com tamanhos pré-determinados para cada oligonucleotídeo. Stone *et al.* (1994), utilizando oligonucleotídeos derivados nos genes *invE* e *A*, descrevem a amplificação em amostras de DNA de *Yersinia* e *Edwardsiella* com padrões de peso molecular superior e facilmente distintos dos observados nas 47 amostras de diversos gêneros de *Salmonella* analisadas.

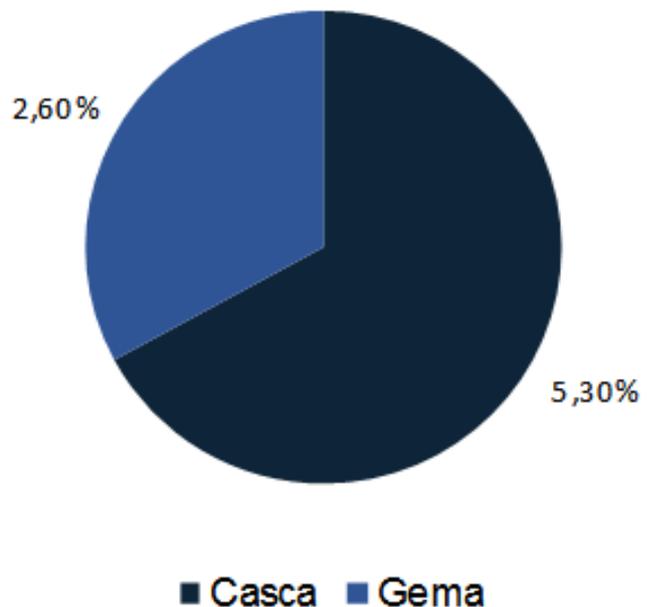
Dados da literatura relatam que a escolha de um método de extração do DNA é uma etapa importante para o processo de amplificação, pois, segundo Luk *et al.* (1993), a permanência de certas substâncias pode interferir na PCR, levando à diminuição da sensibilidade da técnica. Portanto, a técnica de extração pelo fenol-clorofórmio vem sendo considerada superior em relação aos demais métodos de extração de DNA, como comprovado por Flores *et al.* (2001), que, utilizando 100 ovos de galinha contaminados artificialmente com *S. typhimurium*, demonstraram uma diferença de 12% entre amostras positivas extraídas pelo método do fenol comparado com o método de tratamento térmico.

A contaminação de ovos por *Salmonella* é uma questão complexa e influenciada por vários fatores intrínsecos e ambientais. Os ovos intactos podem ser contaminados por duas vias, que incluem: (i) penetração da bactéria na casca a partir de fezes contaminadas durante ou após a ovoposição e (ii) contaminação direta da gema e outros conteúdos internos durante a formação do ovo originários de um traetor reprodutor infectado (WHILEY; ROSS, 2015).

Um total de 76 amostras, sendo 38 de gema e 38 de casca de diferentes tipos e classificações de ovos, foi analisado pela técnica de PCR.

A Figura 2 mostra os resultados em porcentagem de *Salmonella ssp.* na casca e na gema de ovos comercializados na cidade de Fortaleza. Os resultados revelam que 2,6% (1/38) das gemas dos ovos e 5,3% (2/38) das cascas foram positivas para salmonela. A análise estatística demonstra que há associação entre o índice de contaminação e as diferentes partes dos ovos, com  $p < 0,05$  nas duas hipóteses adotadas (casca e gema).

Os levantamentos sobre a presença de salmonela em ovos comerciais e aves de postura demonstram diferenças regionais na prevalência. Resultados obtidos por Oliveira e Silva (2000) utilizando método microbiológico demonstraram índice de contaminação por *Salmonella enteritidis* de 9,6% na casca e 3,2% na gema de amostras de ovos provenientes de estabelecimentos da cidade de Campinas-SP.



**Figura 2:** Detecção de *Salmonella spp* em amostras de casca e gema de ovos comercializados na cidade de Fortaleza por meio da técnica PCR.

Por outro lado, Fehlhaber e Janetschke (1995) descrevem baixos níveis de contaminação em 22.776 amostras de ovos analisadas, em que somente 0,47% das amostras de casca e 0,22% das amostras da gema de ovos estavam contaminados. Baú *et al.* (2001), ao verificar a prevalência de *Salmonella* em conteúdo da casca e gema de ovos de galinha provenientes de fornecedores distintos da região de Pelotas-RS, não detectaram contaminação em nenhuma das 94 amostras analisadas.

Conforme demonstrado na Tabela 3, a incidência de contaminação de *Salmonella spp* nas amostras de superfície (casca) e conteúdo interno (gema) dos diferentes tipos de ovos analisados (branco, vermelho e de codorna) revelou que 2/18 amostras de ovos brancos avaliados apresentaram positividade na casca, 1/14 amostras de ovos de codorna apresentaram positividade na gema, correspondendo a uma incidência de 11,1% e 7,1% de contaminação, respectivamente. A ausência de contaminação em ovos vermelhos apresentado neste estudo pode ser justificada pelo baixo número de ovos analisados.

Flôres *et al.* (2003), ao aplicar a técnica de PCR na detecção de 60 amostras de ovos tipo colonial procedentes de 10 propriedades rurais do distrito de Camobi, em Santa Maria-RS, detectaram contaminação em 4,98% das amostras analisadas. Por outro lado, Campello (2012), ao analisar por PCR 340 amostras de ovos brancos obtidos em supermercados da cidade de Jaboticabal-SP,

encontrou uma incidência de contaminação de 1,47%. Erdogrul (2004), pesquisando 123 amostras de ovos de codorna obtidos em supermercados na Turquia, encontrou contaminação em 5,7% das amostras analisadas. Pesquisa realizada por Katayama *et al.* (2012) mostra que ovos provenientes de codornas mantidas em condições de estresse térmico apresentavam contaminação interna por *Salmonella enterica*, indicando que a alta temperatura ambiental a que as aves são expostas provoca modificações na casca, permitindo a entrada da bactéria nos ovos.

| Tipos    | Casca contaminada | Gema contaminada | Incidência |
|----------|-------------------|------------------|------------|
| Branco   | 2/18              | nd               | 11,1       |
| Vermelho | nd                | nd               | 0          |
| Codorna  | nd                | 1/14             | 7,1        |

**Tabela 3:** Detecção de *Salmonella* spp nos diferentes tipos de ovos pela técnica de PCR.  
nd: (não detectada)

Siqueira *et al.* (2008), utilizando como método de diagnóstico a cultura bacteriana, demonstrou, na análise de 68 amostras de ovos de codornizes comercializados na Região Metropolitana de Fortaleza, ausência de *Salmonella* spp. e o isolamento de diferentes enterobactérias. É sabido que o não isolamento não exclui a possibilidade da presença da bactéria nas amostras analisadas, principalmente quando o método analítico possui baixa sensibilidade (DICKEL *et al.*, 2005).

Em síntese, a contaminação de produtos avícolas por enterobactérias constitui um dos maiores problemas da indústria de alimentos mundial, sendo a manipulação e o acondicionamento inadequados as principais fontes de contaminação (KINDE *et al.*, 2005).

No estado do Ceará, são escassos os trabalhos sobre a incidência de *Salmonella* spp. em ovos e lotes de poedeiras. A detecção da bactéria neste estudo sugere uma possível deficiência no processo de higienização da cadeia produtiva de ovos comercializados para o consumo humano.

## CONCLUSÃO

A técnica de PCR demonstrou ser eficiente na detecção de contaminação por *Salmonella* ssp. em ovos de galinha e codorna comercializados na cidade de Fortaleza-CE. No estado do Ceará, são escassos os trabalhos sobre a incidência de *Salmonella* spp. em ovos e lotes de poedeiras.

Os resultados desta pesquisa sugerem que existe deficiência no processo de higienização da cadeia produtiva de ovos comercializados para o consumo humano e que a técnica de detecção por PCR constitui uma excelente ferramenta de controle.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. A. **Aspectos epidemiológicos e resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. em criações de frangos de corte.** Goiânia, 2012.30f. Seminário apresentado

junto à Disciplina de Seminários aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, nov. 2012.

BARDAQUIM, V.A.; RODRIGUES, J.S.M.; SOUSA, C.P. Segurança alimentar da comunidade com enfoque em *Salmonella* spp. **Uningá Review**, v.8, n.2, p. 21-30, 2011.

BAÚ, A.C.; CARVALHO, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.303-307, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil 2000-2013.** [Acesso em 2015 Abril 30]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2013.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2013.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Portaria nº 1428**, de 28 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para inspeção sanitária de alimentos. [Acesso 2015 jan. 28]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5c5a8a804b06b36f9159bfa337abae9d/Portaria\\_MS\\_n\\_1428\\_de\\_26\\_de\\_novembro\\_de\\_1993.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5c5a8a804b06b36f9159bfa337abae9d/Portaria_MS_n_1428_de_26_de_novembro_de_1993.pdf?MOD=AJPERES)

CAMPELLO, P.L. **Salmonella spp. em Ovos Brancos para Consumo Humano.** Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, São Paulo, 2012.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; VALLE, S.F.; PILOTTO, F.; RODEMBUSH, C.; et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Rev Bras Ciênc Vet**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, jan./dez 2005.

ERDOGRUL, O. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* in Quail Eggs. **Turk J. Anim. Sci.** v.28, n.3, p.597- 601, 2004.

FALD, A.A.; NGUYEN, A.V.; KHAN, M.I. Analysis of *Salmonella enteritidis* Isolates by Arbitrarily primed PCR. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 33, n.4, p. 987-989, 1995.

FEHLHABE, K.; JANETSCHKE, P. **Higiene veterinária de los alimentos.** Acribia :Zaragoza, p. 660, 1995.

FLÔRES, M.L.; NASCIMENTO, V.P.; CARDOSO, M.; SANTOS, L.R.; LOPES, R.F.; BEAT, V.; et al. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciênc. Rural**. v.33, n.3, 2003.

FLÔRES, M.L.; NASCIMENTO, V.P.; KADER, I.I.T.A.; SANTOS, L.R.; PONTES, A.P.; SALLE, C.T.; et al. Métodos de extração de DNA para a detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. **Ciênc. Rural**. 2001, vol.31, n.2, pp. 315-318. ISSN 1678-4596.

GREENWOOD, P.E.; NIKULIN, M.S. In John Wiley & Sons. **A Guide To ChiSquared Testing.** New York, p. 280, 1996.

HARTL, D. L., JONES, E. W. Genetics. In: **Analysis of Genes and Genomes**, 5th ed., Jones & Bartlett Publishers, 2000.

JONG, H.K.; PARRY, C.M.; POLL, T.V.D.; WIERSINGA, W.J. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**, v. 8n.10, e. 1002933, October 2012.

KATAYAMA, E.R.; DONATO, T.C.; VERCESE, F.; GARCIAS, E.A.; OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L. Detection of Salmonella enteritidis in eggs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica* temminck e schlegel, 1849) submitted to cyclic heat stress. **Turk Ver. Vet. Zoot.**, v. 19, n.3. 2012.

KINDE, H.; CASTELLAN, D.M.; KERR, D.; CAMPBELL, J.; BREITMEYER, R.; ARDANS, A. Longitudinal monitoring of two the commercial layer flocks and their environments for Salmonella enterica Serovar Enteritidis and other Salmonellae. **Avian Diseases**, 49: 189-194.2005.

LUK, J.M.C.; KONGMUANG, U.; REEVES, P.R.; LINDBERG, A.A. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of Salmonella major serogroups (A, B, C2, and D). **J Clin Microbiol.** 1993;31:2118-2123

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonella em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arq Bras Med Vet Zootec.** 52(6):655-661. 2000.

OLIVEIRA, V.L.; TAHAM, T. Pesquisa de Salmonella spp. em ovos comercializados na região do Distrito Federal. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 123-130, 2011.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKER, R.C.; CEWE, S.A.; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; et al. Amplification of *invA* gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. **Mol. Cell. Probes**, v.6, p.271-279, 1992.

RISSATO, D.P.; BORGIO, A.P.; MOREIRA, J.P.; BAPTISTA, F.; CONTI, C.M.; RIBEIRO, A.B. Detecção de Salmonella spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). **Rev. Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 35-39, 2011.

SALLES, R.P.R.; TEIXEIRA, R.S.C.; SIQUEIRA, A.A.; SILVA, E.E.; CASTRO, S.B.; CARDOSO, W.M. Monitoramento bacteriológico para Salmonella spp. em poedeira comercial na recria e produção de empresas avícolas da região metropolitana de Fortaleza, CE, Brasil. **Cienc. Anim. Bras**, v.9, n. 2, p. 427-432, 2008.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; PILOTTO, F.; et al. **Identificação de Salmonella através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.29, p.87-92, 2001.

SIQUEIRA, A.A.; CARDOSO, W.M.; SILVA, E.E.; ROMÃO, J.M.; NOGUEIRO, G.C.; ANDRADE, J.M.D.; et al. Identificação de enterobactérias em ovos de codornizes japonesas (*Coturnix japonica*) na Região Metropolitana de Fortaleza – CE, Brasil. **RPCV** v 103, p. 78-82, 2008.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S.; GALLAND, J.; CURTSS, R.; et al. Detection of *S. typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. **J Clin Microbiol**, v.33, n.5, p.1292-1295, 1994.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia** 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008

UBABEF. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). **Relatório anual 2013**. [ acesso 2015 Maio 27]. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>

WHILEY, H.; ROSS, K. Salmonella and Eggs: From Production to Plate. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 2015; 12(3):2543-2556.

**Recebido em 5-OUT-2015**

**Aceito em 26-NOV-2015**