

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

Comparative analysis between conventional microbiological method, ELISA and PCR for the detection of *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* and *S. pullorum* in artificially contaminated broiler meat

Elci Lotar Dickel,* Laura Beatriz Rodrigues,* Luciana Ruschel dos Santos,* Stella de Faria Valle,* Fernando Pilotto,** Carla Rodembush,** Vera Beatriz Wald,** Cláudio Wageck Canal,** Vladimir Pinheiro do Nascimento****

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise comparativa das técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA – SALVIA®) com o método microbiológico convencional para detecção de *Salmonella Enteritidis* (SE), *S. typhimurium* (ST), *S. gallinarum* (SG) e *S. pullorum* (SP) em carne de frango. As amostras foram contaminadas artificialmente com diluições de 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} para SE e ST e de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para SG e SP, com cinco repetições de cada diluição, totalizando 300 análises. Os testes foram realizados em cinco diferentes laboratórios para a validação das técnicas. Na avaliação geral dos dados obtidos, a microbiologia convencional obteve 56,67% (170/300) de recuperação das amostras contaminadas artificialmente, enquanto as técnicas de ELISA e PCR representaram 71% (213/300) e 75% (225/300), respectivamente. A análise dos resultados de detecção de *Salmonella* através dos testes ELISA e PCR, em relação ao microbiológico convencional, apresentaram diferença estatística ($p=0,0001$, teste de MacNemar). Não houve diferença significativa entre os resultados da PCR e do ELISA. Os resultados alcançados demonstraram que, comparado ao microbiológico convencional, tanto o ELISA quanto a PCR foram eficazes para detecção dos sorovares de *Salmonella* nas amostras de carne de frango avaliadas.

Palavras-chave: *Salmonella*, carne de frango, microbiológico convencional, ELISA, PCR.

Abstract

The present experiment aimed at comparing the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA - SALVIA®) with the conventional microbiologic method, for the detection of *Salmonella* Enteritidis (SE), *S. typhimurium* (ST), *S. gallinarum* (SG) e *S. pullorum* (SP) in broiler meat. The samples were artificially contaminated with 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} cells/ml of SE and ST, and 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} cells/ml of SG and SP, with five repetitions of each, giving a total of 300 analyses. In order to validate the techniques used, the tests were performed in five different laboratories. The results showed that the conventional microbiological method was able to recover 56,67% (170/300) of all artificially contaminated samples, while the ELISA and PCR techniques presented recoveries of 71% (213/300) and 75% (225/300), respectively. The differences between each of the latter two and the conventional microbiological method were highly significant ($P= 0,0001$, MacNemar Statistical Test). On the other hand, no significant difference was detected between the ELISA and PCR results. Overall results were able to show that the ELISA and PCR techniques were very efficient in detecting *Salmonella* serovars in the broiler meat samples analysed, when compared to the conventional microbiological method.

Keywords: *Salmonella*, broiler meat, conventional microbiological method, ELISA, PCR.

* Professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS. E-mail para contato: elcidickel@upf.br.

** Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

*** Professora aposentada do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

**** Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Introdução

A ocorrência de infecções alimentares ocasionadas por microrganismos do gênero *Salmonella* é um problema mundial de saúde pública. Devido a esse fato, há necessidade de controle da presença desse agente em alimentos, principalmente os de origem animal (Rodrigues, 2002).

Diferentes produtos alimentícios podem estar contaminados com *Salmonella*. Dentre eles, os produtos cárneos, como frangos inteiros e cortes, podem representar uma ameaça à saúde pública quando apresentam contaminação, preocupando as indústrias avícolas e os consumidores. Metodologias de prevenção a campo e dentro dos matadouros são aplicadas. Entretanto, mesmo com diversas medidas tomadas, a gravidade do problema de toxinfecções alimentares é diminuída, mas não se elimina totalmente o risco para o consumidor (Bryan, 1981; Duguid e North, 1991; Terra, 2001).

De acordo com Nascimento (1995), com relação à carne de frango, está demonstrado que mesmo um pequeno número de aves inicialmente infectadas pode causar a contaminação de toda uma linha de abate e a multiplicação de ocorrências de toxinfecção alimentar, representando uma ameaça à saúde pública em casos onde matadouros não processam as carcaças corretamente.

Santos (2001), relata que os atuais métodos de abate de frangos de corte e práticas de processamento podem disseminar microrganismos de uma carcaça para outra e o consumo desta carne, portanto, envolver a ingestão de bactérias potencialmente patogênicas, introduzindo o agente na cadeia alimentar humana (Santos, 2001).

Para que se possa evitar a ingestão da carne de frango contaminada, a detecção da presença de *Salmonella* neste alimento antes da chegada ao consumidor é de extrema importância. No Brasil, existe uma legislação referente à qualidade microbiológica dos alimentos, onde esse agente deve estar ausente nos diferentes tipos de alimentos testados (Brasil, 2002).

Atualmente, um grande desafio para o controle das contaminações por *Salmonella* é o seu diagnóstico rápido e preciso. O método de diagnóstico mais utilizado é o microbiológico convencional, que requer mais de cinco dias para emitir um resultado positivo. Esse diagnóstico pode ter sua sensibilidade e especificidade questionada devido às grandes variações bioquímicas e mutações genéticas que a *Salmonella* pode apresentar. Além disso, o atraso na emissão de resultados pode comprometer as medidas de controle em matadouros ou a exportação de produtos e subprodutos cárneos.

O período necessário para o diagnóstico pelo microbiológico convencional é uma das principais razões para a realização de um número cada vez maior de pesquisas utilizando novas técnicas de triagem para a detecção de *Salmonella* em alimentos. Dentre as possíveis metodologias a serem empregadas destacam-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e técnicas imunológicas, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Reis et al., 2001; Rodrigues, 2002; Santos, 2001).

A possibilidade do uso de ELISA para detectar *Salmonella* em alimentos já foi estudada em diversos trabalhos, onde se verificou que essa técnica, quando empregada em culturas

puras ou aplicada em alimentos experimentalmente ou naturalmente contaminados, apresentou alta especificidade e/ou sensibilidade nos vários tipos de alimentos testados (Feldsine et al., 1992; Feldsine et al., 1993).

Uma grande variedade de métodos ELISA está disponível comercialmente, especialmente para *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. Essa técnica geralmente requer que o organismo-alvo esteja em uma concentração de 10^6 UFC/mL, apesar de alguns testes relatarem um limite de sensibilidade de 10^4 . Desse modo, o pré-enriquecimento convencional, e mesmo o enriquecimento seletivo, podem ser necessários antes da realização do teste (Forsythe, 2002).

Em pesquisa feita por Brigmon et al. (1995), adaptou-se um ELISA para amostras ambientais para a detecção de *Salmonella enteritidis* (SE) em ovos, pele e carne de aves. Nesse experimento, realizou-se a contaminação dos três tipos de amostras com SE e outras 39 espécies bacterianas, incluindo entre elas 32 diferentes sorovares de *Salmonella*. Nos resultados alcançados, foi demonstrada diferença na sensibilidade do ensaio imunoenzimático quando se correlacionou o material de origem avícola utilizado para testar a detecção de SE. Com esse trabalho, evidenciou-se que a sensibilidade do ELISA para *Salmonella* pode variar conforme o tipo de amostra utilizada.

Tapchaisri et al. (1999) realizaram detecção de *Salmonella* através de microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ELISA de amostras de alimentos de origem avícola e suínica. Entre as 200 amostras de aves e suínos analisados, sendo 100 de cada, 7% e 20%, 7% e 23% e 9% e 33% foram positivas para *Salmonella* pelo microbiológico convencional, PCR e ELISA, respectivamente. Nesse estudo foram realizadas análises de sensibilidade, especificidade, eficácia e valores preditivos positivos e negativos entre os três testes, concluindo-se que o ELISA é o mais simples, rápido, sensível, específico, além de apresentar baixo custo.

Em trabalho realizado por Lambiri et al. (1990), o método ELISA, utilizando um kit comercial da TECRA®, foi comparado ao microbiológico tradicional. Nesse experimento, o ELISA apresentou 95% de concordância com os resultados do microbiológico convencional, com uma taxa de falso-positivos de 5%. Ao final, recomendou-se o ELISA para uso como um teste presuntivo para a detecção de *Salmonella*, e destacou-se a sua praticidade, já que com esse kit os resultados poderiam ser reportados dentro de 48 horas.

Com os avanços científicos disponíveis na atualidade, sistemas moleculares estão sendo empregados como métodos de diagnóstico para diferentes enfermidades. Neste sentido, o diagnóstico de *Salmonella* utilizando-se a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) pode se apresentar como uma alternativa para triagem de amostras, oferecendo resultados em cerca de 48 horas (Pontes, 1999; Oliveira, 2000; Santos et al., 2002).

Infectando pintos oralmente com 10^2 e 10^4 UFC de *Salmonella Gallinarum* e 10^7 UFC de *Salmonella typhimurium*, Turchi et al. (1995) verificaram a eficiência da PCR em amostras de órgãos sem enriquecimento, constatando uma maior sensibilidade da PCR em relação ao microbiológico. Nos casos em que a PCR obteve resultados negativos e o microbiológico positivo, os autores suspeitaram que podem ter obtido pouca quantidade de DNA na fase de extração.

Soumet *et al.* (1996), utilizando amostras ambientais, incluindo *swab* de arrasto, avaliaram a PCR para detectar *Salmonella* a partir do meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV), comparando com duas metodologias microbiológicas. Para ambos os procedimentos, as amostras foram incubadas por 18 a 20 horas em água peptonada tamponada (AP). Os resultados demonstraram uma boa sensibilidade e especificidade da PCR, com 93,1% de concordância com o microbiológico. A PCR realizada a partir do caldo tetracionato (TT) não apresentou resultados satisfatórios e, além disso, os autores atribuíram ao MRSV-PCR a vantagem na detecção de colônias atípicas nos meios de isolamento.

Stone *et al.* (1995) indicam que a inclusão de uma fase de pré-enriquecimento apresenta vantagens sobre o processo de extração direta do DNA, uma vez que meios de enriquecimento são relativamente baratos, requerem pouca manipulação, diluem substâncias que poderiam inibir a PCR e aumentam o número de células bacterianas. Por outro lado, substâncias encontradas em alimentos de origem animal, como sangue e gordura, podem interferir nos resultados da PCR.

Santos *et al.* (2001), em um ensaio utilizando amostras de carne de aves artificialmente contaminadas, detectaram até 10^{-9} UFC/mL de *Salmonella*, após 24 horas de pré-enriquecimento e usando o protocolo fenol-clorofórmio para extração de DNA. O método microbiológico tradicional apresentou o mesmo limite de detecção, mas necessitou 96 horas de análise. Mahon *et al.* (1994) demonstraram, experimentalmente, uma maior sensibilidade da PCR para detecção de *Salmonella* e relação à microbiologia convencional.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise comparativa da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) com o método microbiológico convencional, para detecção de *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella gallinarum* (SG) e *Salmonella pullorum* (SP) em carne de frango contaminada artificialmente.

Material e métodos

As análises foram realizadas em cinco diferentes laboratórios, denominados A, B, C, D e E. O número de laboratórios foi determinado de acordo com os métodos internacionais da AOAC para validação, qualificação e quantificação de métodos microbiológicos, bem como a determinação do número de amostras (AOAC International, 2001).

Para cada diluição dos quatro sorovares sob exame fizeram-se cinco repetições, analisando, então, 15 amostras por sorovar. Desse modo, cada laboratório realizou 60 análises, perfazendo um total de 300 amostras. Além das contaminações artificiais, em cada laboratório foram efetuadas cinco repetições de amostras controle, não contaminadas, totalizando 25 análises, as quais foram submetidas às três técnicas de detecção de salmonela.

Para obtenção da matéria-prima para realização das análises, foram coletadas 30 carcaças de frango em matadouro de Inspeção Federal. Cada carcaça foi analisada individualmente, em duplicata, pela técnica microbiológica convencional (MC), de acordo com a Portaria nº 08 de 23/1/1995, a qual institui o método analítico de carcaças de aves e pesquisa de

Salmonella (Brasil, 1995). Todas as carcaças analisadas foram negativas para a presença de *Salmonella*. Essas carcaças, após a análise, tiveram toda a pele e musculatura fragmentada em pedaços de aproximadamente 2cm, os quais foram acondicionados em sacos plásticos estéreis e armazenados a -20°C , até a realização da contaminação artificial.

Os sorovares selecionados para uso no experimento são os que integram o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) (BRASIL, 1995), sendo esses *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella gallinarum* (SG) e *Salmonella pullorum* (SP). As cepas utilizadas foram previamente isoladas de carne de aves pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com sorotipificação realizada pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para a contaminação artificial, cada sorovar de SE, ST, SG e SP foi incubado em caldo BHI a 37°C por 18 horas, sendo, após, diluídos em água peptonada tamponada a 0,1%, utilizando-se as diluições de 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} para inoculação de SE e ST e de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para SG e SP, de acordo com Oliveira (2000). Para confirmação das unidades formadoras de colônias (UFC) por mL, foi realizada contagem, em duplicata, por semeadura em profundidade de 1 mL da amostra, em ágar PCA, incubado por 24 horas a 37°C , sendo então efetuada a contagem das UFCs de cada diluição.

Para a contaminação artificial, de cada análise foram pesados 25g da carne de frango armazenada, já descongelada e refrigerada, em sacos plásticos estéreis específicos para utilização nos homogeneizadores tipo *stomacher*. Após, adicionou-se 1 mL da diluição dos sorovares e homogeneizou-se a amostra, que foi encaminhada para realização das técnicas.

A metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella sp.* foi baseada na Portaria nº 08 de 23/1/1995, a qual institui o método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* (Brasil, 1995). O caldo utilizado para pré-enriquecimento foi a água peptonada tamponada 1% (AP1% - Merck), adicionando-se 225 mL dessa AP1% aos 25 g da carne de frango já contaminada, incubando-os por 18 a 24 horas a 37°C . Para o enriquecimento seletivo foram utilizados dois caldos, o caldo Rappaport-Vassiliadis (RV - Merck) e o tetracionato (TT - Difco). O caldo tetracionato foi acrescido de 200 μL de solução iodoiodetada, 100 μL solução de verde brilhante a 0,1% e 10 μL de solução aquosa de novobiocina a 4%.

De cada uma das amostras semeadas nos caldos de pré-enriquecimento, foram inoculados 0,1 mL da solução em 9,9 mL do caldo RV e 1,0 mL em 9 mL do caldo TT. Os dois caldos foram incubados em banho-maria, a 42°C , por 18 a 24 horas. Foram utilizados dois tipos de ágar seletivo e diferencial no experimento, o ágar verde brilhante com novobiocina (BGN - Merck) e o ágar Rambach® (Rambach® - Merck). Cada material proveniente do caldo RV foi plaqueado com alça bacteriológica de 10 μL nos dois tipos de ágar, BGN e Rambach®. O mesmo procedimento foi realizado com o caldo TT. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas.

De cada material que havia sido plaqueado, de três a cinco colônias que se apresentavam compatíveis com *Salmonella* foram selecionadas para realização do exame bioquímico preliminar. Esse consistia na realização da semeadura das colônias com agulhas de platina em quatro testes: ágar tríplice açúcar e ferro (TSI - Difco), ágar lisina descarboxilase (LIA -

Merck), ágar semi-sólido para detecção de indol, H₂S e verificação da motilidade (SIM - Merck) e caldo uréia (Difco). Também foram semeadas em ágar nutriente (AN - Merck), para a posterior realização da caracterização antigênica. Todos os bioquímicos foram incubados a 37°C por 18 a 24 horas.

Os bioquímicos compatíveis com *Salmonella* foram submetidos a soroaglutinação em lâmina utilizando anti-soro polivalente para o antígeno somático "O", "A - I" e "VI" (Poli O - Difco), testados e negativos para a auto-aglutinação. Adicionou-se 1 mL de solução salina a 0,85% no tubo com AN que foi homogeneizado para se obter uma suspensão bacteriana do crescimento. Retiraram-se 50 µL da suspensão, que foi homogeneizada em uma lâmina com 50 µL de solução salina a 2%, para que uma possível aglutinação indicasse se a amostra estava rugosa. Em amostras não rugosas, depositaram-se 50 µL da suspensão bacteriana sobre uma lâmina que já continha 50 µL de anti-soro polivalente O e homogeneizou-se bem. Em casos positivos observou-se a presença de grumos na suspensão da lâmina. Com esse resultado, confirmava-se a recuperação do sorovar em estudo, sendo a amostra considerada positiva na técnica microbiológica convencional.

A partir do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), após a incubação, foram retiradas alíquotas de 1 mL do RV, em triplicata, acondicionadas em tubos de microcentrífuga. As amostras foram conservadas sob congelamento a -20°C até a realização das análises. Para a realização da PCR, o DNA foi extraído através do protocolo de tratamento térmico (Santos et al., 2001). O protocolo de reação da PCR foi constituído por 2,5 mL de tampão concentrado 10 vezes (10mM de MgCl₂, 500mM de KCl, 100mM de Tris HCl pH 8,3; Cenbiot^{Enzimas}); 2 mL da solução de dNTP (5mM; GibcoBRL); 2 mL (20 rmol de cada iniciador separadamente); 0,2 mL de *Taq* DNA polimerase 5U/mL (Cenbiot^{Enzimas}); 2 mL de amostra de DNA e água milliQ até o volume final de 25 mL. Os ciclos constaram de uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturação (93°C/1 minuto), anelamento (50°C/30 segundos) e extensão (72°C/1 minuto), com uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Os produtos amplificados foram submetidos a duas horas de eletroforese a 100 V (Gel Electrophoresis Apparatus GNA 100, Pharmacia) em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo (GibcoBRL) em tampão de TBE 10X (45mM Tris borato, 1mM EDTA pH 8,0) (Sambrook et al., 1989). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação de um fragmento de 284 pb, visualizado sobre luz ultravioleta.

A técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizada conforme a indicação do fabricante do *kit* (*Salmonella* Imunoensaio Visual (SALVIA®)- TECRA®). Após o período de incubação do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) foi retirado 1 mL do mesmo, o qual foi adicionado a 10 mL de caldo M-Broth (M-Broth -TECRA), incubados a 37°C por seis a oito horas. O caldo M-Broth, após incubação, foi submetido a tratamento térmico para inativação dos microrganismos presentes. Para tanto, os tubos foram colocados em banho-maria, submetidos a 100°C por 15 minutos. Aguardou-se o resfriamento das amostras para continuação das análises. Transferiu-se uma alíquota de 200 µL dos controles positivos e negativos e de cada uma das amostras para cada cavidade da microplaca. Incubou-se a placa a 37°C por 30 minutos. Realizou-se a lavagem por três vezes. Adicionaram-se 200 µL

do conjugado em cada cavidade e incubou-se a microplaca a 37°C por 30 minutos. Realizou-se a segunda lavagem por quatro vezes. Acrescentaram-se 200 µL do substrato e manteve-se a placa à temperatura ambiente por 15 minutos. Após, a leitura visual dos resultados pôde ser realizada com auxílio do cartão de cor que acompanha o kit, comparando a coloração das cavidades com o mesmo.

Os resultados foram analisados pelo Método Qui-quadrado e McNemar, utilizando o programa estatístico SPSS for Windows, Versão 10.05, SPSS, Inc. 1999.

Resultados e discussão

Na avaliação geral dos dados obtidos, o microbiológico convencional obteve 56,6% (170/300) de recuperação das amostras contaminadas artificialmente, enquanto o ELISA recuperou 71% (213/300) e o PCR 75% (225/300) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados obtidos na recuperação de *Salmonella*, através da Microbiologia Convencional (MC), ELISA e PCR, em carnes de frango contaminadas artificialmente.

Parâmetros	MC (n=300)	ELISA (n=300)	PCR (n=300)
Positivos	170 ^a	213 ^b	225 ^b
Porcentagem (%)	56,6	71	75

^{a, b}: valores indicados pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si (p0,05).

A análise dos resultados da detecção pelo ELISA e pelo PCR, em relação ao microbiológico convencional, apresentou diferença estatística, com p=0,0001, através do teste de MacNemar. Não houve diferença comparando os resultados do PCR contra o ELISA.

Os resultados obtidos pela microbiologia convencional e PCR são semelhantes àqueles observados por Oliveira (2000), que avaliou a eficiência da técnica PCR em relação ao método microbiológico convencional na detecção de *Salmonella* isolada de materiais avícolas. Esse autor constatou que, das 53 amostras analisadas, a PCR recuperou 28 (53%), enquanto o método microbiológico convencional apenas 13 (24,52%).

No presente trabalho realizou-se, também, a avaliação das três técnicas quanto à detecção dos quatro sorovares utilizados. Os resultados obtidos estão citados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados obtidos na detecção de *Salmonella typhimurium* (ST), *S. enteritidis* (SE), *S. gallinarum* (SG) e *S. pullorum* (SP), pelo microbiológico convencional (MC), ELISA e PCR, em amostras de carne de frango contaminada artificialmente.

Técnicas	ST (n=75)	SE (n=75)	SP (n=75)	SG (n=75)
MC	64 ^a	53 ^a	19 ^a	34 ^a
ELISA	72 ^b	71 ^b	24 ^a	46 ^b
PCR	71 ^b	66 ^b	39 ^b	49 ^b

^{a, b}: valores indicados pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p0,05).

O método microbiológico convencional, entre as três técnicas, foi a metodologia que detectou o menor número de amostras positivas. Tanto o ELISA quanto o PCR foram superiores na detecção de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*, com exceção da *S. Pullorum*, onde somente a PCR foi o método mais eficaz, sendo o microbiológico convencional e o ELISA estatisticamente semelhantes.

Avaliando o desempenho das técnicas por sorovar, observou-se que as três metodologias utilizadas detectaram um número menor de amostras contaminadas pelas salmonelas aviárias (SG e SP), quando comparado com a detecção das amostras contaminadas por salmonelas paratíficas (SE e ST). Isso pode ser explicado devido à dificuldade de crescimento que a *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum* apresentam, quando expostos à flora acompanhante (Oliveira, 2000). A *Salmonella Pullorum* foi o sorovar com menor detecção pelas três técnicas, possivelmente em função de apresentar crescimento lento, quando comparado, por exemplo, com o abundante crescimento da *Salmonella Gallinarum* (Reis e Nobrega, 1956).

A Tabela 3 demonstra os resultados obtidos nos cinco laboratórios onde foram avaliadas as metodologias.

Tabela 3 – Resultados obtidos na detecção de *Salmonella Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Pullorum* (SP) e *S. Gallinarum* (SG) pela microbiologia convencional (MC), ELISA e PCR, nos cinco laboratórios utilizados.

Laboratórios	MC (n=60)	ELISA (n=60)	PCR (n=60)
A	21 ^a	33 ^b	34 ^b
B	26 ^a	49 ^b	57 ^c
C	48 ^a	46 ^a	57 ^b
D	30 ^a	38 ^a	31 ^a
E	45 ^a	47 ^a	46 ^a

^{a, b}: valores indicados pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si (p0,05).

Foi constatada uma grande variabilidade entre os resultados obtidos em cada laboratório, quanto à recuperação das amostras contaminadas. No laboratório A o método microbiológico convencional foi, entre os três métodos, o que detectou o menor número de amostras positivas, apresentando diferença estatística quando comparado com o ELISA e a PCR. No

laboratório B houve diferença significativa entre os três métodos estudados, sendo que a PCR apresentou melhor eficácia na recuperação das amostras contaminadas. O mesmo foi observado no laboratório C, porém não houve diferença estatística significativa entre microbiologia convencional e ELISA. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as três técnicas nos laboratórios D e E.

A variabilidade entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios indicam que fatores relacionados com a qualidade dos procedimentos adotados, dos equipamentos disponíveis e do conhecimento do técnico responsável podem interferir nos resultados das técnicas.

Comparando a exequibilidade entre as três técnicas (PCR, ELISA e microbiológico), a técnica de ELISA foi a mais prática, em função da menor complexidade na realização dos procedimentos para sua execução. Inclusive, foi a metodologia que obteve a menor variabilidade nos resultados obtidos nos cinco laboratórios, conforme demonstrado na Tabela 3.

O método microbiológico convencional, além de ser bastante laborioso, requer um tempo mínimo de cinco dias para obtenção do diagnóstico, podendo estender-se até sete dias, caso sejam realizados testes bioquímicos complementares e sorologia para determinação do sorovar. O ELISA obteve os resultados no máximo em três dias nas amostras negativas, enquanto que, nas amostras positivas, a técnica necessita da confirmação pela microbiologia convencional, conforme recomendações do fabricante, o que prolonga o resultado do teste. Com relação ao PCR, que também obtém o resultado em até três dias, esse não necessita da confirmação dos resultados positivos através da microbiologia convencional.

Entretanto, deve-se considerar que o isolamento do agente, no caso a *Salmonella*, se faz de grande importância, uma vez que a partir do mesmo realiza-se a sorotipificação dos isolados, aspecto esse de grande importância quando se considera o valor epidemiológico da determinação dos sorovares, além da sua considerável influência na rastreabilidade dos produtos de origem animal.

Conclusões

Os resultados alcançados demonstraram que, comparado ao microbiológico convencional, tanto o ELISA quanto o PCR foram superiores na detecção de *Salmonella* nas amostras de carne de frango contaminadas artificialmente. Devido à praticidade na realização do ELISA, recomenda-se a utilização dessa técnica como teste de triagem para a detecção de *Salmonella* em amostras de carne de frango, visto que auxilia para uma determinação mais rápida das amostras negativas.

Referências

- AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*. [on line] Disponível em URL: <http://www.aoac.gov.br>. Acesso em: 5 Jun. 2001.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 03, de 9 de janeiro de 2002. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria da Defesa Agropecuária. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como Livres de *S. gallinarum* e de *S. pullorum* e Livres ou Controlados para *S. enteritidis* e para *S. typhimurium*. *Diário Oficial* [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 9 de janeiro de 2002.

- BRASIL, Portaria nº 126 de 3 de novembro de 1995. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria da Defesa Agropecuária. Normas para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico de Salmonelose Aviárias (*S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* e *S. typhimurium*) *Diário Oficial* [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, nº 212, p.1798, 6 de novembro de 1995, seção 1.

- BRIGMON, R.L.; ZAM, S.G.; WILSON, H.R. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with enzyme-linked immunosorbent assay. *Poultry Science*, v. 74, n. 7, p. 1232-1236, jul. 1995.

- BRYAN, F.L. Current trends in foodborne Salmonellosis in the United States and Canada. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 44, n. 5, p. 394-402, May, 1981.
- DUGUID, J. P.; NORTH, A. E. Eggs and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. *Journal Medical Microbiology*, v. 34, p. 65-72, 1991.
- FELDSINE, P. T.; FALBO-NELSON, M. T.; HUSTEAD, D. L. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, v. 75, n. 6, p. 1032-1044, 1992.
- _____. Polyclonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, v. 76, n. 3, p. 694-697, 1993.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 217.
- LAMBIRI, M.; MAVRIDOU, A.; RICHARDSON, S. C.; PAPADAKIS, J. A. Comparison of the TECRA *Salmonella* Immunoassay with the conventional culture method. *Letters in applied microbiology*, v. 11, 182-184, 1990.
- MAHON, J.; MURPHY, C. K.; JONES, P. W.; BARROW, P. A. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. *Letters in Applied Microbiology*, v. 19, p. 169-172, 1994.
- NASCIMENTO, V. P. Salmoneloses Aviárias: uma revisão. In: Simpósio Técnico de Matrizes de Corte da Associação Catarinense de Avicultura (ACAV), 1., 1995. Chapecó. *Anais...*, p. 51-52.
- OLIVEIRA, S.D. *Deteção e Identificação de Salmonella sp., Salmonella Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum e S. Pullorum através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola*. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- PONTES, A. P. *Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), na detecção de Salmonella sp em amostras ambientais de origem avícola ("swab" de arrasto)*. 1999. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- REIS, J., NÓBREGA, P. *Tratado de doença das aves*. São Paulo: Melhoramentos; 1956.
- REIS, REGINA BAPTISTA DOS, MAMIZUKA, ELSA MASAE AND FRANCO, BERNADETTE DORA GOMBOSSY DE MELO. Production of immunoreagents to be used in an enzyme immunoassay for detection of *Salmonella*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, set./dez. v. 21, n. .3, p. 261-266. ISSN 0101-2061, 2001.
- RODRIGUES, L.B. *Levantamento sorológico e detecção de Salmonella em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do Estado do Rio Grande do Sul*. 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3v.
- SANTOS, L.R. *Fagotipagem e Análise por RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) de amostras de Salmonella Enteritidis isoladas de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares*. 2001. 178 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK, H.; D'ANDRÉA, A.; ALBUQUERQUE, M. C. B.; RAMPANELLI, Y.; MACHADO, N. P.; RIOS, S.; FERNANDES, S. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares ocorridas entre 1995 e 1996 no Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, p. 93-100, 2002.
- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; SILVA, N. N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, L. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.
- SOMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of Different DNA Extraction Procedures for the Detection of *Salmonella* from Chicken Product by Polymerase Chain Reaction. *Letters in Applied Microbiology*. n. 19, p. 294-298. 1996.
- STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P. et al. Detection of *Salmonella* Typhimurium from Rectal Swabs of Experimental Infected Beagles by Short Cultivation and PCR-Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. May. v. .33, p. 1292-1295, 1995.
- Tapchaisri, P.; Wangroongsarb, P.; Panbangred, W.; kalambaheti, T.; Chongsanguan, M.; Srimanote, P.; Kurazono, H.; Hayashi, H.; Chaicumpa, W. Detection of *Salmonella* contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. *Asian Pac J Allergy Immunol*, Mar., v. 17, n. 1, p. 41-51, 1999.
- TERRA, C. Avicultura de postura na virada do milênio. *Revista Rural*, ano. IV, p. 50, 2000. [on line] Disponível em URL: <http://www.megaagro.com.br>. Acesso em: 5 jun. 2001.
- TUCHILI, L. M.; KODAMA, H.; IZUMOTO, Y.; et al. Detection of *S. Gallinarum* and *S. Typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine Science*, n. 57 p. 59-63. 1995.