



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO GENÉTICO E
MOLECULAR

**DETECÇÃO DE *SALMONELLA* EM REPRODUTORAS DE
FRANGO: COMPARAÇÃO ENTRE REAL TIME PCR E DOIS MÉTODOS
MICROBIOLÓGICOS (SEMI-SÓLIDO RAPPAPORT-VASSILIADIS E
DUPLO ENRIQUECIMENTO)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil, para obtenção do Título de Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular.

PRISCILLA KARINA VITOR KOERICH

Orientador: Dr. NILO IKUTA

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio de sempre, essenciais em todas as etapas da minha vida.

Ao Cleber pelo incentivo, compreensão, disposição e dedicação incondicionais que me permitiram superar todas as dificuldades.

À minha irmã, minha paixão e melhor amiga, pela grande amizade e apoio.

As novas amigas Thaís Boeira e Ana Wobeto. Thaís obrigada pela amizade, mas principalmente pelo e apoio nos momentos difíceis.

Ao Nilo pela orientação, mas principalmente pela compreensão e amizade.

À Simbios por ter me recebido tão bem.

Ao Eder pelo auxílio laboratorial. Ao João, por me substituir com responsabilidade, honestidade e competência.

À Perdigão por ter dado a oportunidade de eu ingressar no mestrado.

À Maria Eduarda pela paciência em esperar pelo meu retorno.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Luterana do Brasil e financiado pela FINEP (convênio nº 01.02.0132.00).

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Classificação	7
1.2. PNSA.....	9
1.3 Cultivo microbiológico.....	10
1.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	13
1.5. PCR em Tempo Real – qPCR.....	14
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO II	
Comparison between real time PCR and two cultural procedures, modified semi-solid rappaport-vassiliadis and delayed secondary enrichment, for <i>Salmonella</i> detection in poultry breeding flocks	17
CAPÍTULO III	
1. PERSPECTIVAS	36
2.CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do kit NewGene™ - Real Time PCR (qPCR) para detectar *Salmonella* em 19 lotes de aves reprodutoras em comparação com os procedimentos bacteriológicos tradicionais – Rappaport Semi-sólido Modificado (MRSV) e duplo enriquecimento seletivo (DSE). Quatrocentos e trinta e seis amostras foram coletadas: propés, órgãos, fundos de caixas sujos com mecônio e pó dos aviários. A *Salmonella* foi detectada respectivamente pelo MRSV, DSE e qPCR em 75, 96 e 99 amostras; 61% destes resultados em completa concordância entre todos os testes, 16,8% em pelo menos 2, e 22,1% em uma delas (principalmente qPCR e DSE). O teste do χ^2 foi utilizado para analisar o número de resultados positivos obtidos por todos os métodos, demonstrando que o MSRVS obteve resultados significativamente mais baixos quando comparado com DSE e qPCR. O diagnóstico relativo de sensibilidade, especificidade, acurácia e índice kappa foram avaliados considerando o resultado de TODOS OS MÉTODOS com o padrão ouro, mostrando excelente concordância, com acurácia do MSRVS 91,3%, DSE 96,1% e qPCR 96,8%. As sensibilidades dos métodos MSRVS, DSE e qPCR foram de, respectivamente, 66,4%; 85,0%, 87,6%. O índice kappa demonstrado dos 3 ensaios estão altamente correlacionados, com o DSE e qPCR estão muito próximos quando relacionados com TODOS OS MÉTODOS (respectivamente 0.89 e 0.91). Os resultados utilizando a qPCR foram obtidos em 2 dias, demonstrando ser uma técnica mais rápida e mais fácil de se realizar quando comparadas com o MSRVS e DSE (4 a 6 dias).

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of NewGene™ Real Time PCR kits* (qPCR) to detect *Salmonella* in 19 poultry breeding flocks in comparison with the traditional culture procedures - modified semi-solid rappaport-vassiliadis (MSRV) and delayed secondary enrichment (DSE). Four hundred thirty six samples were collected, consisting of overshoes, viscera, meconium swabs, and dust of poultry houses. *Salmonella* was detected by MSRV, DSE and qPCR respectively in 75, 96 and 99 samples; 61% in complete agreement in all tests, 16.8% in at least 2, and 22.1% in one of them (mainly qPCR and DSE). The χ^2 test was used to analyze the number of positive results from all methods and showed significant lower positive results for MSRV than for both DSE and qPCR. Relative diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and kappa index were evaluated considering ALL METHODS results as a gold standard, showing excellent agreement, with accuracy of MSRV 91.3%, DSE 96.1% and qPCR 96.8%. Sensitivities of MSRV, DSE and qPCR were 66.4%; 85.0%; 87.6%, respectively. Kappa index demonstrated that all 3 assays are highly correlated, with DSE and qPCR very closely related with ALL METHODS (respectively 0.89 and 0.91). The qPCR could be carried out in 2 days, demonstrating to be faster than MSRV and DSE (4 to 6 days) and easy to perform.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de carnes de frangos do mundo, seguindo os EUA e a China. Em 2006 foram produzidas 9.700.000 toneladas, sendo que 31,44% da produção foram destinadas à exportação (ABEF, 2007). A constante evolução da avicultura nacional propiciou a conquista de novos mercados e o crescimento das exportações.

A *Salmonella* sp é um microorganismo relacionado com patologias que afetam a produtividade na avicultura, além de ser um dos principais patógenos transmitidos ao homem através de alimentos de origem animal. O seu controle na cadeia de produção é fundamental na manutenção e ampliação do mercado interno e externo. Ela está amplamente distribuída na natureza, aumentando seu ingresso em praticamente todos os aspectos da cadeia de alimentação humana. Como qualquer outro microorganismo ligado à cadeia alimentar, o controle da infecção humana depende primariamente da manutenção de um alto padrão de higiene, tanto pelos produtores quanto pelos consumidores (Manfio, 2003).

1.1 Classificação

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo caracterizados como Gram negativos, não esporogênicos, normalmente móveis (exceto *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), usualmente não encapsulados, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos (Popoff & LeMinor, 1997).

No gênero *Salmonella* estão incluídos mais de 2.500 sorotipos. Esta variabilidade antigênica tem dificultado esta classificação gerando muita controvérsia até os dias de hoje. A última proposta relativa à taxonomia e nomenclatura propõe dividir o gênero *Salmonella* em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis

subespécies bioquimicamente distintas (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) que são ainda diferenciadas em centenas de sorotipos (sorovares) identificados por nomes ou números. A subespécie *enterica* agrupa as salmonelas associadas às infecções em humanos e animais de sangue quente, enquanto as demais subespécies e a *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio (Brenner, 2000; Tindal *et al*, 2005).

Conforme Back (2002), a infecção das galinhas por salmonela pode induzir as manifestações clínicas de formas distintas. Tradicionalmente eram classificadas com base no quadro clínico em: Pulorose (*S. Pullorum*), Tifo Aviário (*S. Gallinarum*) e Paratifo (*Salmonella* sp. móveis ou paratíficas). A classificação mais recente baseia-se na sua importância como agente causador de doenças nas aves e de risco para a saúde pública. Conforme a epizootiologia e patogenicidade dos diferentes sorotipos a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* são divididas em 3 grupos:

- **Grupo 1:** incluindo os sorotipos Gallinarum e Pullorum que causam respectivamente a pulorose e o tifo aviário.
- **Grupo 2:** estão incluídas neste grupo todas as salmonelas móveis do tipo paratíficas com exceção dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.
- **Grupo 3:** os sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

A infecção sub-clínica é freqüente onde os hospedeiros tornam-se portadores assintomáticos com eliminação intermitente ao meio ambiente (Guerin *et al*, 2005). Atualmente, a maior parte das epidemias em humanos está relacionada pela infecção dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium (Durecko *et al.*, 2004). O aumento na ocorrência de determinado sorotipo está diretamente relacionado à adaptação deste a uma espécie animal, a qual consiste de um reservatório para posterior contaminação humana através da alimentação. (Durecko *et al.*, 2004).

1.2 PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE AVÍCOLA (PNSA)

A salmonela pode ser efetivamente reduzida e com freqüência eliminada através de um programa intensivo testando toda a cadeia avícola e eliminando a fonte de infecção. O essencial para o sucesso é um programa com testes suficientemente sensíveis desde as reprodutoras até os frangos de corte, incluindo incubatórios, fábricas de ração, entre outros. Um efetivo programa de controle de salmonelas em carcaças envolve, obrigatoriamente, o controle de contaminação na ave viva e ambiente criatório, antes do abate das aves (pré-abate). Nestes casos, o objetivo é reduzir o número de frangos portadores de salmonela no abatedouro.

O programa oficial brasileiro para o controle de salmonelas das granjas avícolas está descrito no Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA (IN N°. 3/2002 – DOU de 16/01/2002). Este programa aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum*; e livres ou controladas para *S. Enteritidis* e para *S. Typhimurium*. O programa é aplicado a aves reprodutoras com o intuito da produção de pintos de cortes livres ou com baixo índice de contaminação para os sorovares especificados.

Na cadeia de produção avícola a detecção de salmonela deve ser feita a partir de amostras de fezes, órgãos internos, ovos, embriões de aves doentes ou portadoras sem sintomas, rações e matérias primas. O monitoramento do ambiente em que as aves vivem serve para monitorar a infecção do lote. (Charlton *et al.*, 2005; Kinde *et al.*, 2004). O processo de detecção convencional da salmonela envolve as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo, identificação bioquímica, identificação de sorogrupo e sorotipificação. A inclusão ou omissão de alguma destas etapas relatadas devem

ser testadas (Charlton *et al.*, 2005). Para o processo completo são necessários pelo menos sete dias para confirmar um resultado positivo e três a quatro dias para fornecer um resultado negativo (Maciorowski *et al.*, 2005).

1.3 Cultivo Microbiológico

A bacteriologia convencional continua sendo a base para os protocolos de detecção de *Salmonella* (Davis *et al.*, 2000), onde os métodos mais utilizados envolvem as seguintes etapas:

PRE-ENRIQUECIMENTO: A amostra é incubada em um meio não seletivo para recuperar células injuriadas para uma condição fisiológica estável (Malorny *et al.*, 2004). A água peptonada é o meio de escolha para o pré-enriquecimento. O tempo de incubação é de 18 - 24 horas a uma temperatura de 35°C (Brasil, 1995a), enquanto a portaria nº 126 de 3 de novembro de 1995 recomenda o pré-enriquecimento através do uso de 20 mL de caldo de cérebro e coração adicionadas a 2 gramas da amostra (Brasil, 1995b).

ENRIQUECIMENTO SELETIVO: O enriquecimento seletivo é necessário para o isolamento de *Salmonella* sp a partir de amostras que contenham flora bacteriana mista, como alimentos, amostras de fezes e autópsias. A etapa de enriquecimento seletivo visa a aumentar o número de salmonela em relação aos outros microorganismos presentes nas amostras (Rybolt, 2005). Este procedimento é feito após o pré-enriquecimento ou diretamente da amostra quando se suspeita que a amostra contém um número considerável de bactérias. (Back, 2002). De acordo com as normas do método analítico de carcaças de aves e pesquisa de salmonela do Ministério da Agricultura, alíquotas de 0,1 mL de culturas pré-enriquecidas devem ser transferidas para tubos que contenham 10 mL de caldo Tetrionato ou caldo Selenito-cistina. Os tubos devem ser incubados

a 42°C a 43°C, por 18 a 24 horas (Brasil, 1995a). A portaria nº 126 de, 03 de novembro de 1995 recomenda o uso dos caldos Tetrionato e Rappaport-Vassiliadis (Brasil, 1995).

Um método bastante utilizado no enriquecimento seletivo é o uso de meios semi-sólidos seletivos como o MSRV (Semi-sólido Modificado Rapaport Vassiliadis). O princípio desta técnica é baseado na motilidade apresentada pela maioria das bactérias pertencentes aos sorovares da *Salmonella*, na qual resulta na migração do microorganismo através do ágar (Voogt *et al.*, 2001). O semi-sólido Rappaport-Vassiliadis é adequado para o isolamento de *Salmonella* em alimentos (De Zutter *et al.*, 1991; O'Donoghue & Win, 1993; Van der Zee, 1994; De Boer, 1998; De Médici *et al.*, 1998), amostras de aves (Read *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1998) e amostras ambientais (Read *et al.*, 1994). Em particular, a eficiência no isolamento de *Salmonella* pertencente ao grupo D, incluindo cepas de *Salmonella* Enteritidis, parece ser superior usando o meio semi-sólido (Van der Zee, 1994; Raes *et al.*, 1999). O desempenho do meio semi-sólido MSRV foi significativamente maior quando comparado com o RV para detecção de *Salmonella* em amostras de fezes em poedeiras e frangos comerciais (Voogt *et al.*, 2001). A superioridade do MSRV foi atribuída à habilidade em detectar baixos números de células bacterianas (50 por mL) (De Smedt & Bolderdijk, 1987). Uma outra vantagem do MSRV é a rapidez, resultados positivos em apenas 48h. A detecção de *Salmonella* lactose-positiva e H₂S-negativo é também uma vantagem do uso do MSRV comparado a outros meios. Além disso, é uma técnica menos laboriosa, altamente aplicável e com baixo custo (Zdragas *et al.*, 2000).

Outro método de enriquecimento seletivo bastante utilizado é o Duplo Enriquecimento Seletivo, que tem sido utilizado para identificar com efetividade os lotes infectados por *Salmonella* (Rigby & Pettit, 1980; Kinde *et al.*, 2004). O segundo enriquecimento para o isolamento de *Salmonellae* significa transferir

uma quantidade significativa do inóculo do enriquecimento seletivo primário num segundo caldo seletivo antes do cultivo em ágar seletivo (Rigby & Pettit, 1980). O enriquecimento secundário aumenta a recuperação de salmonela de codornas infectadas experimentalmente, galinhas, ambiente das aves e amostras suínas (Pourceau & Springer, 1978; Waltman *et al.*, 1991; Nietfeld *et al.*, 1998).

Os mecanismos responsáveis pelo aumento no índice de isolamento de *Salmonella* no duplo enriquecimento seletivo não são totalmente conhecidos. Apesar de ele aumentar a taxa de isolamento, há também um aumento no custo dos meios de cultura, no trabalho de laboratório e na demora para a obtenção dos resultados (Nietfeld *et al.*, 1998).

PLAQUEAMENTO EM ÁGAR SELETIVO: A terceira etapa, último procedimento utilizado antes da caracterização bioquímica na pesquisa de Salmonela, é o isolamento e seleção. Nesta etapa o material é semeado em meios sólidos, preparados em placas de Petri com ágar, e incubado a 37°C por 18 a 24 horas. Estes meios inibem o crescimento de outras bactérias favorecendo o crescimento das salmonelas e permitem o fácil reconhecimento das colônias. Os meios sólidos mais utilizados são o ágar Verde Brilhante, o ágar Hektoen, o ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD) (Back, 2002).

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA: A quarta etapa é a caracterização bioquímica onde as colônias suspeitas devem ser selecionadas e submetidas a provas bioquímicas. As salmonelas são diferenciadas por fermentarem glicose, manitol, xilose, maltose, dulcitol, ornitina, lisina, vermelho de metila e citrato, reduzirem nitrato a nitrito e produzirem H₂S (gás sulfídrico). Não fermentam uréia, gelatina, lactose, sacarose, salicina, malonato e indol. As salmonelas, exceto os sorotipos *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum*, são móveis.

CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA: A quinta etapa é a caracterização antigênica onde colônias compatíveis bioquimicamente à espécie *Salmonella* são tipificadas. Para a tipificação utiliza-se uma série de anti-soros que identificam antígenos flagelares “H” e antígenos somáticos “O”. O método usado é o esquema de Kauffman – White onde os sorogrupos são identificados por letras e números. Embora existam mais de 2.500 sorotipos de salmonelas já identificadas, pouco mais de 200 foram isolados de aves. Cerca de 10 sorotipos representam mais de 80% dos isolamentos de galinhas e perus. As salmonelas imóveis, sorotipos Pullorum e Gallinarum, podem ser diferenciadas dos outros sorotipos de *Salmonella* entérica.

1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR):

O método convencional de isolamento e identificação de salmonela usualmente requer de 3-5 dias. Na maioria dos casos, torna-se inviável uma rápida e estratégica tomada de decisão (Maciorowski, 2005). Em virtude desta necessidade, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma poderosa ferramenta no diagnóstico microbiológico na última década.

A padronização dos métodos de detecção por PCR de agentes de importância para a cadeia produtiva deverá cumprir vários critérios desde a acurácia analítica e de diagnóstico, probabilidade de alta detecção, robustez, baixa contaminação, e aceitação por protocolos de fácil aplicação e interpretação. (Malorny *et al.*, 2003).

Os primeiros testes de PCR foram desenvolvidos para detecção de salmonela a partir de bactérias isoladas. A presença de inibidores para a técnica de PCR dificultou a aplicação direta a partir das diferentes amostras biológicas. Inibidores podem interferir em diferentes níveis na técnica de PCR: lise celular,

degradação ou captura de ácidos nucleicos e inativação da polimerase termoestável (Al-Soud & Radström, 1998).

A remoção de substâncias inibitórias da PCR mostrou-se essencial em materiais como sangue e fezes. Foi demonstrada que moléculas como a hemoglobina, a bilirrubina e os sais biliares, são importantes inibidores da PCR (Fluit *et al.*, 1993, Lou *et al.*, 1997, Widjojoamodjo *et al.*, 1992).

A alternativa para diminuir a ação dos inibidores da PCR foi a utilização de etapas de enriquecimento prévias à amplificação por PCR. As vantagens do uso desta etapa são as diluições dos inibidores e concentração da bactéria. Atualmente, a maioria dos trabalhos desenvolvidos para pesquisa de salmonela, considera uma ou mais etapas de enriquecimento. A água peptonada tamponada (BPW – Buffered-Peptide-Water) é um dos meios mais usados (Löfström, 2004).

1.4 PCR EM TEMPO REAL – qPCR

Uma segunda geração de diagnóstico molecular para detecção de salmonela em alimentos está em desenvolvimento crescente e tem sido usado como uma ferramenta rápida e confiável para o controle de amostras contaminadas ao longo da cadeia produtiva. A técnica denominada PCR em Tempo Real (qPCR) combina os processos de amplificação e detecção num mesmo equipamento. Alguns dos ensaios de detecção por qPCR já foram descritos para detecção de *Salmonella* em alimentos. O método consiste numa etapa de pré-enriquecimento de aproximadamente 18 h das amostras em Água Peptonada Tamponada, seguida de purificação e extração do DNA bacteriano. Toda a análise consiste em aproximadamente 24h, em contraste com os 7 dias de cultura pelo método tradicional (Marlony *et al.* 2004; Nam *et al.* 2005). Segundo Seo (2004) e Ellingson (2004) a qPCR nos experimentos realizados, mostrou-se rápida e muito sensível para ensaios de detecção e quantificação de amostras de

pool de ovos com baixas concentrações de *Salmonella* Enteritidis, quando comparados aos meios de isolamento tradicionais. Em contrapartida, há poucos estudos sobre o diagnóstico por qPCR para detecção de salmonela em espécimes biológicas utilizadas para o controle da cadeia produtiva avícola.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A salmonelose é um problema crônico na indústria avícola com piora na qualidade de carne além da redução da produtividade dos plantéis. A indústria de alimentos é comprometida com a saúde pública nos aspectos de contaminação de carne e ovos por *Salmonella*, e utiliza um rigoroso processo de controle de qualidade dos produtos. Para reduzir os níveis de contaminação, a indústria incorporou programas de monitoramento dos plantéis. Para medir a eficiência da identificação e controlar os lotes infectados, os procedimentos de detecção devem ser suficientemente sensíveis e rápidos. Atualmente os controles de monitoramentos são baseados em métodos microbiológicos tradicionais.

Técnicas baseadas em Biologia Molecular vêm ganhando destaque no diagnóstico de agentes patogênicos, devido a características como: alta sensibilidade, especificidade e, principalmente, rapidez. O objetivo deste estudo foi de avaliar a eficiência do Real Time PCR (qPCR – kit comercial NewGene™) para detectar *Salmonella* em lotes de aves reprodutoras em comparação com os procedimentos microbiológicos tradicionais – Modificado Semi-sólido Rappaport (MSRV) e Duplo pré-enriquecimento (DSE).

CAPÍTULO II

Comparison between real time PCR and two cultural procedures, modified semi-solid rappaport-vassiliadis and delayed secondary enrichment, for *Salmonella* detection in poultry breeding flocks

Key words: delayed secondary enrichment, modified semi-solid rappaport-vassiliadis, real time PCR, *Salmonella*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of NewGene™ Real Time PCR kits* (qPCR) in the detection of *Salmonella* in 19 poultry breeding flocks in comparison with the traditional culture procedures - modified semi-solid rappaport-vassiliadis (MSRV) and delayed secondary enrichment (DSE). Four hundred thirty six samples were collected, consisting of overshoes, viscera, meconium swabs, and dust of poultry houses. *Salmonella* was detected by MSRV, DSE and qPCR in 75, 96 and 99 samples, respectively; 61% in complete agreement in all tests, 16.8% in at least 2, and 22.1% in one of them (mainly qPCR and DSE). The MSRV procedure showed significant lower positive results for than both DSE and qPCR. Relative diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and kappa index were evaluated considering ALL METHODS results as gold standard, showing excellent agreement, with accuracy of MSRV 91.3%, DSE 96.1% and qPCR 96.8%. Sensitivities of MSRV, DSE and qPCR were respectively of 66.4%; 85.0%; 87.6%. Kappa index demonstrated that all 3 assays are highly correlated, with DSE and qPCR very closely related with ALL METHODS (0.89 and 0.91, respectively). The qPCR could be carried out in 2 days, demonstrating to be faster than MSRV and DSE (4 to 6 days) and easy to perform.

* SIMBIOS BIOTECNOLOGIA Manufacturer, Brazil.

INTRODUCTION

Salmonella continues to be a major food-borne pathogen and poultry products are one of the most important vehicles for its transmission to humans. Poultry become infected by consumption of contaminated feed or water and through infected environment (Uyttendaele *et al.*, 2003). To reduce contamination of chicken carcasses, it is important to control *Salmonella* infection along the food-production chain. Thus, *Salmonella* prevention can only be achieved by rapid and reliable screening programs (Eygor *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; De Medici *et al.*, 2003).

Despite considerable advances in new diagnostic methods, conventional bacteriology remains the foundation of *Salmonella* detection protocols (Davis *et al.*, 2000). The standard methods involve preenrichment in buffered peptone water (BPW), selective enrichment in Rappaport-Vassiliadis (RV) or Tetrathionate Broth (TTB), plating on selective agar, and subsequent identification by serological tests (Knutsson *et al.*, 2002; Löfström *et al.*, 2004). Other methods are based on the use of so-called “semisolid” selective medium as Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV). These methods are widely used for *Salmonella* isolation from food, stool specimens, poultry samples and environmental samples (Voogt *et al.*, 2001).

The Delayed Secondary Enrichment method (DSE) has been used to ensure the effectiveness of identifying *Salmonella* infected flocks (Rigby & Pettit, 1980; Kinde *et al.*, 2004). This method consists in transferring an inoculum from an incubated primary selective enrichment medium to a second fluid medium, which is then appropriately incubated before subculturing in selective agar (Rigby & Pettit, 1980). Some studies showed that DSE resulted in significantly higher *Salmonella* recoveries than direct enrichment (Tate & Miller, 1990) in samples of bobwhite quail (Pourciau & Springer, 1977), chickens, chicken environments, cattle (Charlton *et al.*, 2005; Waltman *et al.*, 1991) and pig faeces (Davies *et al.*, 2000; O’Carrol *et al.*, 1999; Nietfeld *et al.*, 1998).

Polymerase Chain Reaction (PCR) has become a powerful tool in microbiological diagnostics. Hoorfar *et al.* (2000) described a Real Time PCR (qPCR) for

Salmonella enterica identification that could correctly identify all tested *Salmonella* strains and isolates (210 from more than 30 serogroups) and resulted in negative amplification in all 120 non-*Salmonella* strains, including *Citrobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Listeria*, *Shigella* etc. Marlorny *et al.* (2004) described a qPCR for *Salmonella* detection in food, the authors analyzed one 110 samples (chicken rinses, minced meat, fish and raw milk) after previous preenrichment in BPW followed by DNA extraction. They demonstrated a diagnostic accuracy of 100% when compared to the traditional culture method.

Malorny and Hoorfar (2005) described that although substantial PCR standardization efforts have been done on food samples, important primary samples such as feed and faeces have not yet received sufficient attention. The purpose of the present study was to evaluate the efficiency of NewGene™ Real Time PCR kits* (qPCR) to detect *Salmonella* in 19 poultry breeding flocks in comparison with the traditional culture procedures - modified semi-solid rappaport-vassiliadis (MSRV) and delayed secondary enrichment (DSE).

MATERIAL AND METHODS

The samples used in this study were originated from 19 commercial poultry breeder flocks from 3 Brazilian states (São Paulo, Minas Gerais and Santa Catarina). Four hundred thirty six samples were collected (between 4 to 78 samples/flock) from June 2005 to July 2006, consisting of overshoes (314), viscera (72), meconium swabs from the bottom of the chick boxes (43), and dust of poultry houses (7). Analyses of meconium samples (from the bottom of the boxes) were performed to check all new broiler breeder flocks introduced into a farm (40 boxes per flock). Overshoes from litter and dust of poultry houses were collected every 2 weeks (4 overshoes per poultry house after 3 weeks of age).

Three diagnostic methodologies were used to detect *Salmonella*, (a) Real Time PCR (qPCR), in the kit format NewGene™ supplied by SIMBIOS BIOTECNOLOGIA, Brazil,

(b) cultivation in Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) and

(c) Delayed Secondary Enrichment (DSE).

All these methods were performed using the same Buffered Peptone Water aliquot (BPW) from a common preenrichment step as schematically outlined in Figure 1.

MICROBIAL CULTURE PROCEDURES

The same procedures of preenrichment and confirmation of *Salmonella* were performed in MSRV and DSE. The selective enrichment of MSRV and DSE were described below and outlined schematically in Figure 1. The culture media BPW, MSRV medium, RV broth, Tetrathionate broth (TTB), and xylose-lysine desoxycolate with tergitol-4 agar (XLT4) were prepared according to the instructions of the manufacturer.

PREENRICHMENT

The preenrichment was carried out by adding samples into Whril-Pak bag containing BPW. The samples of overshoes (2 per bag), pool viscera, boxes swabs and 25 g of dust of poultry houses were added respectively in 276, 150, 200 and 225 mL of BPW (to reach final concentration of 10%). The bags were homogenized for 1 min in a Stomacher and incubated at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 18 to 24 h.

SELECTIVE ENRICHMENT

Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV). Three drops of BPW (0.1 mL) were inoculated in separated spots on the surface of an MSR plate and incubated at 42°C in an air circulation incubator (direct motility enrichment). MSR plates were checked for migration after 24 h of incubation in the direct motility enrichment. From the migrated cultures, a loopful from the edge of migration was streaked onto XLT4 plate.

Delayed Secondary Enrichment (DSE). The primary and secondary enrichment were performed in 2 media, RV to RV (0.1 mL inoculum in 9.0 mL at 42°C), and TTB to TTB (1.0 mL of inoculum in 9.0 mL at 37 and 42 ° C), with incubations for 18-24 h. Following these steps, both RV and TTB cultures were streaked onto XLT4 agar and incubated at 37°C for 24h.

CONFIRMATION

The XLT4 plates derived from MSR, RV and TTB. Presumptive *Salmonella* colonies were serologically examined by slide agglutination with *Salmonella* polyvalent O-antiserum (Leminnor and Poppof, 1988). For additional serotyping, isolates were sent to the reference laboratory – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil).

MOLECULAR PROCEDURES

Purification of nucleic acids: From the preenrichment BPW, 1.0 mL was transferred into a 1.5 mL plastic tube and centrifuged (10 000 x *g*, 1 min). The pellet was mixed with 200 uL sterile PBS; then nucleic acids were extracted according to described by Boom *et al.* (1990). One hundred microliters of PBS sample was added to 400 uL of lysis buffer (5M guanidine thiocyanate, 0.5 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4], 0.65% Triton X-100) and then incubated at 60°C for 10 min. After centrifugation (10 000 x *g*, 1 min), the supernatant was transferred to a clean tube containing 20 uL silica suspension. After vortex and centrifugation (10 000 x *g*, 1 min), the pellet was washed twice with 150 uL GuSCN-Tris buffer (5 M guanidine thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4]), twice with 80% ethanol and twice with 96% ethanol. The silica suspension was dried and DNA was eluted with 50 uL of elution buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA).

NEWGENE™ Real Time PCR (qPCR): The *inv A* primers and the probe used in this work were supplied by SIMBIOS BIOTECNOLOGIA, in the NewGene™ Real

Time PCR kit. It is based on the procedure described by Hoorfar *et al.* (2000), with the probe labeled with the fluorescent dye 6-carboxyfluorescein (FAM; reporter dye) on the 5' end and MGB and the quencher dye on the 3' end.

The Real Time PCR analysis was performed using a PE Applied Biosystems 7700 Sequence Detector System with the following program: 3 min at 95°C, and 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 55°C. PCR amplifications were carried out in 1X PCR buffer with 5-carboxy-Xrhodamine [ROX] as passive reference dye. The amplification and product reporting system was based on the 5' nuclease assay well-known Taqman assay (Holland *et al.*, 1991)

STATISTICAL ANALYSIS

The proportion of positive vs. negative samples among the distinctive methods was compared using chi-square (X^2) test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Standard procedures were used to calculate sensitivity and specificity for each method. Accuracy was calculated too, as the sum of positive-positive and negative-negative results expressed as a percentage. Finally, Kappa index was determined indicating the strength of the relationship between variables of a cross tabulation (with values > 0.7 indicating inter-rater reliability as satisfactory).

RESULTS

In total, 436 samples from 19 broiler breeder flocks were tested in this study. *Salmonella* was not detected by Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and NewGene™ Real Time PCR (qPCR) in 12 flocks (63.2%) and was detected in 7 flocks (37.8%). One hundred thirty seven and 299 samples were tested, respectively, in negative (average of 11.4 samples per flock) and positive flocks (average of 43 samples per flock). Considering all positive samples, *Salmonella* were identified in 113 (37.8%) samples for at least one of the tested assays (see Table 1, column ALL METHODS). Positive flocks were higher sampled than negative ones because they have been confirmed by intensive test.

Salmonella was detected by MSRV, DSE and qPCR respectively in 75, 96 and 99 samples; 61% in complete agreement in all tests, 16.8% in at least 2, and 22.1% in one of them (mainly qPCR and DSE - Table 2).

All suspected colonies from MSRV and DSE were serologically confirmed using polyvalent antigen O antiserum. One hundred seventy one isolates were serotyped, confirming consistently the identification of *Salmonella* in the flock. No contradictory serotyping results were found between 75 MSRV and 96 DSE isolates. One flock from Minas Gerais state was infected with serotype Infantis (21 samples), 1 flock from São Paulo state with Corvallis (29 samples), 3 flocks from São Paulo, Minas Gerais and Santa Catarina states with Enteritidis (111 samples) and 2 flocks from the same region of Santa Catarina were co-infected with Enteritidis and Ohio serotypes (15 samples).

All data from the 7 infected flocks have indicated that all positive results obtained by all methods were related with true positives. The MSRV procedure showed significant lower positive results than both DSE and qPCR ($p < 0.05$).

Relative diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and kappa index of these 3 assays were evaluated considering ALL METHODS results as the gold standard (see Table 3 and 4). All 3 assays showed excellent agreement with ALL METHODS results, with accuracy of MSRV 91.3%, DSE 96.1% and qPCR 96.8%.

Sensitivities of MSR/V, DSE and qPCR were of 66.4%; 85.0%; 87.6%, respectively. Kappa index demonstrated that all 3 assays are highly correlated (>70%), with DSE and qPCR very closely related with ALL METHODS (respectively 0.89 and 0.91). The results obtained indicated that MSR/V detected less *Salmonella* and also that DSE and qPCR presented similar better performances.

DISCUSSION

This study analyzes *Salmonella* detection efficiency in broiler breeder flocks using Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSR/V), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and NewGene™ Real Time PCR (qPCR). The samples were collected over a period of 1 year in 19 flocks from 3 Brazilian states. This survey showed that *Salmonella* was found in 7 flocks; two from the Brazilian states of São Paulo and Minas Gerais, infected by serotypes Infantis and Corvalis, respectively and 5 flocks from São Paulo, Santa Catarina and Minas Gerais infected with Enteritidis (2 of them co-infected with Ohio – from Santa Catarina). The performance of DSE and qPCR was significantly better than MSR/V with higher sensitivity and accuracy.

MSR/V is frequently used in *Salmonella* screening programs. When compared with others procedures based in one selective enrichment step, MSR/V is described to be more efficient. For example, MSR/V showed to be more sensitive than the standard selective medium Rappaport-Vassiliadis Broth (RV) in works analyzing samples of food and feed (Wiberg and Norberg, 1996), poultry faeces (Voogt *et al.* 2001), wastewater and broiler chicken's organs (Zdragas *et al.* 2000). Furthermore, the efficiency of isolation of *Salmonella* belonging to group D (including strains of *Salmonella* Enteritidis, the widely spread serotype) seems to be higher using MSR/V (Van der Zee, 1994; Raes *et al.*, 1999). In our study, despite *Salmonella* could be detected by MSR/V in all 7 positive flocks, we showed that the procedure based on this medium failed to detect approximately 33.6% of positive samples, even in flocks infected with Enteritidis. This result indicated that DSE or qPCR could represent better choices for *Salmonella* screening.

Delayed Secondary Enrichment (DSE) is reported to increase *Salmonella* isolations from poultry and swine-related materials (Rigby & Pettit, 1984; Rigby, 1984). Many DSE protocols were described and modifications are related with selective medium choice and cultural conditions (temperature and time of incubation, volume of inoculum etc). For example, Rigby and Pettit (1984) used BPW for preenrichment, primary and second enrichment in TTB broth. Nietfeld *et al.* (1998) inoculated samples directly in 3 primary enrichments followed by a second one in the same media, respectively TTB to TTB (37°C), 3MC to 3MC (37°C) and RV to RV (42°C). These 2 works demonstrated that DSE superiority was mostly apparent where *Salmonella* is expected in very low concentration, or in cases which an injured or damaged *Salmonella* cells, or samples with predominance of other bacteria species (Eyigor & Carli, 2003; Kinde *et al.*, 2004).

In our study, all samples were pre-enriched in BPW, and primary and secondary enrichment were performed in 2 media, TTB to TTB (37 and 42 ° C), and RV to RV (42°C). Suspect colonies were not isolated all the time in both enrichment media (data not shown), indicating better results with the use of this combination. DSE showed to be very specific and sensitive, but 2 drawbacks are related with this method: it is very laborious and time-consuming assay. On the other hand, special equipments or reagents are not required, allowing this procedure be introduced in any laboratory that performs microbiological assays.

Promising perspectives to develop a faster and less laborious technique will be prosecuted in further studies, as recently proposed by Klerks *et al.* (2006) testing qPCR for *Salmonella* quantification from soil, manure and compost samples, evaluating different DNA extraction methods – they could detect 10³ cells per 100 mg of sample without prior cultivation procedure.

The NewGene™ Real Time PCR (qPCR) utilized in the present study is based on Hoorfar *et al.* (2000). This choice was based on intensive studies of inclusion (could identify all 210 *Salmonella enterica* isolates) and exclusion (no false positives detection of 120 non *Salmonella* isolates). We also adopted the BPW preenrichment step followed by DNA extraction recommended by Malorny (2004) to detect *Salmonella* in food samples.

The qPCR has showed to be an excellent alternative to analyze samples from animal protein production chain. We could efficiently detect *Salmonella* in samples from faeces (collected by foot-shoes from litter), viscera from suspected birds, meconium of chick box paper and dust of poultry houses. The qPCR could be carried out in 2 days, demonstrating to be faster than MSR/V and DSE (4 to 6 days). The molecular assay is also easy to perform and very sensitive.

The major drawback of qPCR is its requirement of the sophisticated and high cost equipment. However, an increasing number of research and commercial laboratories are introducing Real Time PCR, taking the advantages of testing a large number of samples in a versatile, practical and automated process. Probably, in a near future this technology will be available at a very good cost-benefit ratio.

The effects of qPCR inhibitions that could generate false negative results or any procedure to analyse not viable *Salmonella* cells (false positives) were not evaluated, as proposed by Hoorfar (2000) and Klerks (2006) using internal controls, by Nogva *et al.* (2003) using ethidium monazide in qPCR or analyzing threshold cycles (CTs) before and after cultivation as proposed by Fujiwara *et al.* (2006). Nevertheless, our results, compared with the cultivation procedures (MSRV and DSE), demonstrated high correlation. Therefore, if false positive results eventually occurred, they did not represent statistical relevance.

ACKNOWLEDGMENTS

This present work was supported by FINEP (process n° 01.02.0132.00). We would like to express our gratitude to SIMBIOS BIOTECNOLOGIA, for the technical assistance.

REFERENCES

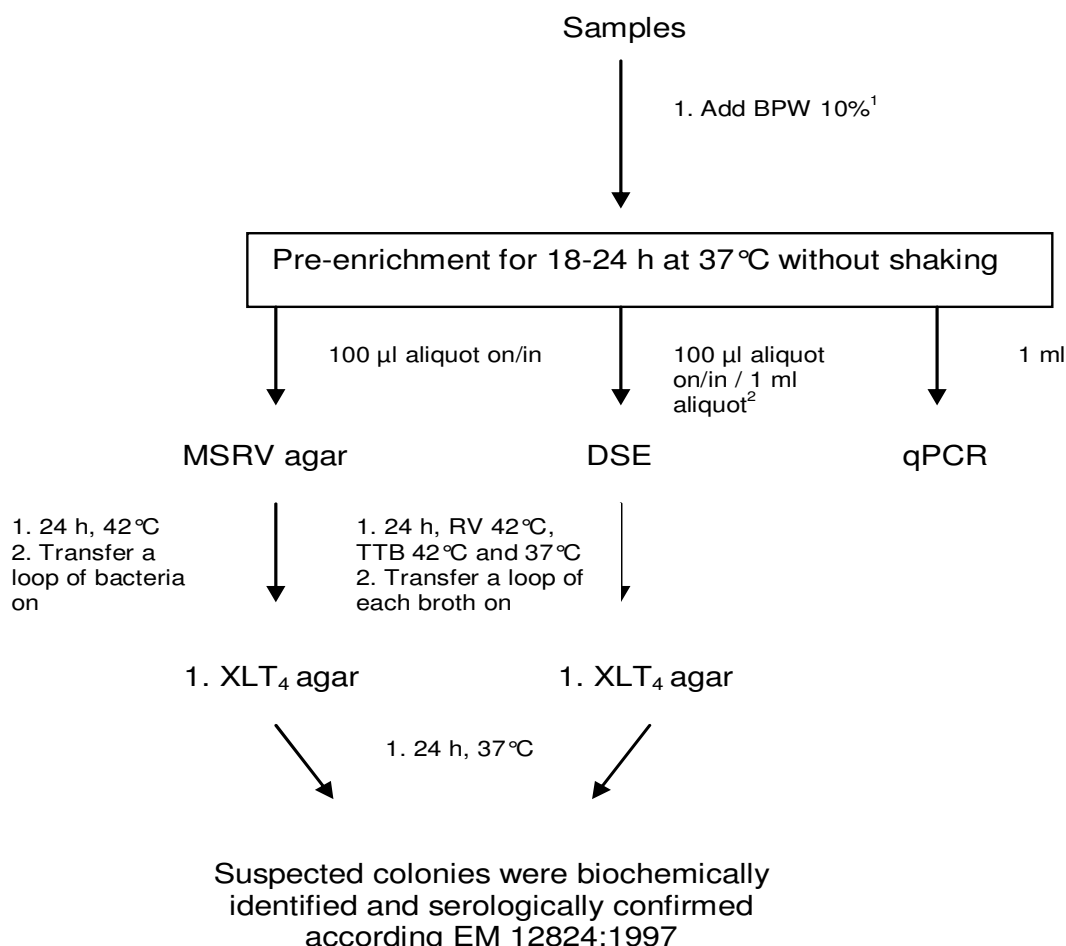
- BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3):495-503, 1990.
- CHARLTON, B.R., WALKER, R.L., KINDE, H., BAUER, C.R., CHANNING-SANTIAGO, S.A., FARVER, T.B. Comparison of *Salmonella* Enteritidis-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella* Enteritidis in environmental drag swab samples. *Avian Diseases* 49:418-422, 2005.
- DAVIS, P.R., TURKSON, P.K., FUNK, J.A., NICHOLS, M.A., LADELY, S.R., FEDORKA-CRAY, P.J. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology* 89:169-177, 2000.
- De MEDICI, D., CROCI, L., DELIBATO, E., DI PASQUALE, S., FILETICI, E., TOTI, L. Evaluation of DNA Extraction methods for use in combination with SYBR Green I Real Time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3456-3461, 2003.
- DE SMEDT JM. AOAC Validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. Association of Official Agricultural Chemists. *International Journal Food Microbiology* 45:25-28, 1998.
- EYIGOR, A., CARLI, K.T., UNAL, C.B. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Letters in Applied Microbiology* 34:37-41, 2002.
- EYIGOR, A., CARLI, K.T. Rapid Detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Diseases* 47:380-386, 2003.
- FUJIKAWA H, SHIMOJIMA Y, YANO K. Novel method for estimating viable *Salmonella* cell counts using real-time PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 47:51-156, 2006.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease

- activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 88:7276–7280, 1991.
- HOORFAR, J., AHRENS, P., RADSTÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3429-3435, 2000.
- KLERKS MM, VAN BRUGGEN AH, ZIJLSTRA C, DONNIKOV M. Comparison of methods of extracting *Salmonella enterica* serovar Enteritidis DNA from environmental substrates and quantification of organisms by using a general internal procedural control. *Applied Environmental Microbiology* 72(6):3879-3886, 2006.
- KNUTSSON, R., LÖFSTRÖM, C., GRAGE, H., HOORFAR, J., RADSTÖM, P. Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 52-60, 2002.
- KINDE, H., CASTELLAN, D.M., KASS, P.H., ARDANS, A., CUTLER, G., BREITMEYER, R.E., BELL, D.D., ERNST, R.A., KERR, D.C., LITTLE, H.E., WILLOUGHBY, D., RIEMANN, H.P., SNOWDON, J.A., KUNEY, D.R. The Occurrence and Distribution of *Salmonella* Enteritidis and others serovars on California egg laying premises: A Comparison of two sampling methods and two culturing techniques. *Avian Diseases* 48:590-594, 2004.
- LE MINOR, L., POPOFF, M.Y. In Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella – Institut Pasteur, Paris, 5th revision, 1988.
- MARLONY B., HOOFAR, J. Rapid toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: Lessons from the detection of Salmonellae in pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 43:3033-3037, 2005.
- LIU T, LILJEBJELKE K, BARTLETT E, HOFACRE C, SANCHEZ S, MAURER JJ. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *Journal of Food Protection* 65:1227-1232, 2002.
- LÖFSTRÖM, C., KNUTSSON, R., AXELSSON, C.E., RADSTRÖM, P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology* 70:69-75, 2004.
- MALORNY B, HOORFAR J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonella e* in pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7):3033-3037, 2005.
- NIETFELD, J.C., KELLY, B., DRITZ, S.S., FEDER, I., GALLAND, J.C. d Comparison of conventional and delayed secondary enrichment for isolation of

- Salmonella* spp. from swine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10:285-287, 1998.
- NOGVA HK, DROMTORP SM, NISSEN H, RUDI K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 34(4):804-813, 2003.
- NUCERA DM, MADDOX CW, HOIEN-DALEN P, WEIGEL RM. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. *Journal of Clinical Microbiology* 44(9):3388-3390, 2006.
- O'CARROL, J.M., DAVIES, P.R., CORREA, M.T., SLENNING, B.D. Effects of sample storage and delayed secondary enrichment on detection of *Salmonella* spp in swine feces. *American Journal of Veterinary Research* 60:359-362, 1999.
- OLIVEIRA, S.D., RODENBUSCH, C.R., CÉ, M.C., ROCHA, S.L.S., CANAL, C.W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology* 36:217-221, 2003.
- POURCIAU, S.S., SPRINGER, W.T. Evaluation of secondary enrichment for detecting *Salmonellae* in Bobwhite Quail. *Avian Diseases* 22:42-45, 1977.
- RAES, M., VOOGT, N., SCHULTEN, S.M., NAGELKERKE, N., VAN DE GIESSEN, A.W. Vergelijking van methoden voor *Salmonella* isolatie uit pluimveefeces. *De Ware(n)-Chemicus* 29:129-136, 1999.
- RIGBY, C.E., PETTIT, J.R. Delayed Secondary Enrichment for the Isolation of *Salmonellae* from Broiler Chickens and Their Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 40:783-786, 1980.
- RIGBY CE. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Applied Environmental Microbiology* 47(6):1327-1330, 1984.
- TATE, C.R., MILLER, R.G. The isolation of *Salmonellae* from Poultry Environmental Samples by Several Enrichment Procedures Using Plating Media with Without Novobiocin. *Poultry Science* 69:721-726, 1990.
- 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* 37:386-391, 2003.
- VAN DER ZEE, H. Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* 21:41-46, 1994.

- VOOGT, N., RAES, M., WANNET, W.J.B., HENKEN, A.M., VAN DE GIESSEN, A.W. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology* 32:89-92, 2001.
- WALTMAN, W.D., HORNE, A.M., PIRKLE, C. Use of delayed secondary enrichment for the isolation of *Salmonella* in Poultry and Poultry Environments. *Avian Diseases* 35:35-88, 1991.
- WIBERG C, NORBERG P. Comparison between a cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth and motility enrichments on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection from food and feed. *International Journal of Food Microbiology*. 29:353-60. 1996.
- ZDRAGAS A, TSAKOS P, MAVROGENI P. Evaluation of two assays, MSRV and RV, for the isolation of *Salmonella* spp. from wastewater samples and broiler chickens. *Letters Applied Microbiology* 31(4):328-31, 2000.
- ZIEMER, C. J., S. R. STEADHAM. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters Applied Microbiology* 37:463-469, 2003.

Figure 1. Schematic flow diagram of the experimental protocol for the Isolation of *Salmonella* in Poultry and Poultry Environments. Abbreviations: BPW, buffered peptone water; MSRV, modified semi-solid Rappaport Vassiliadis; DSE, Delayed Secondary Enrichment; TTB, Tetrathionate Broth; RV, Rappaport Vassiliadis Broth; XLT₄, xylose-lysine desoxycolate with tergitol-4 agar



¹ Overshoes: 276 ml of BPW was added to each Whirl-Pak bag. Viscera: 150 ml of BPW was added to each Whirl-Pak bag. Chick box paper: 200 ml of BPW was added to each Whirl-Pak bag. Dust of poultry houses: 25g of the sample and 225 ml of BPW.

² 100 µl aliquot on/in RV and 1ml aliquot on/in TTB

Table 1: Evaluation of 3 procedures (MSRV, DSE and qPCR) for *Salmonella* detection using the same BPW preenrichment followed by procedures. ALL METHODS include all positive samples where at least one assay showed positive results. The samples were collected in 19 broiler breeder flocks and serotyping was performed in all 75 positive samples from MSRV and 96 from DSE.

Flock	state	Serotype	n° of samples	n° of positive <i>Salmonella</i> samples			
				ALL METHODS	MSRV	DSE	qPCR
1-12	SP MG SC	-	137	0	0	0	0
13	MG	Corvalis	21	19	14	15	17
14	SC	Enteritidis	66	30	18	27	22
15	MG	Enteritidis	75	15	13	13	14
16	SP	Infantis	20	15	6	15	13
17	SP	Enteritidis	24	24	20	20	24
18	SC	Enteritidis Ohio	78	7	2	3	6
19	SC	Enteritidis Ohio	15	3	2	3	3
TOTAL			436	113	75	96	99

Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and Real Time PCR (qPCR).

Table 2: Number of *Salmonella* positive samples (% number positive samples/total positives) detected by 3 procedures (MSRV, DSE and qPCR) from 7 infected broiler breeder flocks.

MSRV	DSE	QPCR	N° samples	(%)
+	+	+	69	61.1
+	+	-	3	2.7
+	-	+	1	0.9
-	+	+	15	13.3
+	-	-	2	1.8
-	+	-	9	8.0
-	-	+	14	12.4
Total			113	100

Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and Real Time PCR (qPCR).

Table 3: Comparative results for *Salmonella* detection by MSR/V, DSE and qPCR assays. ALL METHODS include all positive samples where at least one assay showed positive results.

		All methods		
		Positive	Negative	Total
MSRV	Positive	75	0	75
	Negative	38	323	361
	Total	113	323	436
DSE	Positive	96	0	96
	Negative	17	323	340
	Total	113	323	436
qPCR	positive	99	0	99
	negative	14	323	337
	Total	113	323	436

Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and Real Time PCR (qPCR).

Table 4: Comparison of sensitivity, specificity, accuracy and kappa index between MSR/V, DSE and qPCR for *Salmonella* detection. These 3 assays were compared with ALL METHODS results (include all positive samples where at least one assay showed positive results).

	All methods			
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Kappa index
MSRV	66,4	100	91,3	0,75
DSE	85,0	100	96,1	0,89
qPCR	87,6	100	96,8	0,91

Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium (MSRV), Delayed Secondary Enrichment (DSE) and Real Time PCR (qPCR).

CAPÍTULO III

1) PERSPECTIVAS

A salmonela é um dos principais patógenos da indústria de alimentos, e em muitos países, ela é a principal causa de surtos de toxi-infecções alimentares. No comércio mundial de alimentos, o risco de infecções microbianas aos consumidores é uma das principais preocupações. Desta maneira, para se obter um bom programa de segurança alimentar é necessário um sistema rápido e internacionalmente aceito para a detecção de patógenos.

O MSRV é uma das técnicas microbiológicas mais utilizadas no controle de qualidade em alimentos, amostras ambientais, amostras de plantéis de aves e suínos devido às vantagens de praticidade e baixo custo. No nosso estudo, o MSRV demonstrou-se menos sensível que o duplo enriquecimento e qPCR na detecção de *Salmonella* em lotes de matrizes de frango de corte. Para que o MSRV possa ser melhor empregado, projetos de pesquisa tentando aumentar a sensibilidade de detecção seriam recomendáveis. Modificações na formulação do meio, adição de antimicrobianos, alterações nas relações de volumes a serem transferidos, tempo de incubação etc. seriam pontos críticos que poderiam ser facilmente testados. Outra abordagem que deveria ser reavaliada está relacionada com a amostragem necessária para realização deste teste. Assim, através da coleta e análise de um maior número de amostras por lote, poderia-se compensar a menor sensibilidade analítica do MSRV.

Seria recomendável uma abordagem semelhante ao estudo deste trabalho (comparação de técnicas de detecção) nas distintas etapas de produção industrial, onde se utiliza o MSRV como método de “screening”. Neste sentido, poderia se avaliar a ocorrência de resultados falso-negativos na monitoria de lotes de frangos de corte, controle da infecção em abatedouros, controle de qualidade de alimentos etc. Este estudo teria como objetivo direcionar a escolha de um melhor procedimento a ser adotado em cada etapa do processo industrial.

A introdução do qPCR ou duplo pré-enriquecimento na monitoria de salmonela em lotes de matrizes, deveria ser seriamente considerada pelas

agroindústrias e laboratórios que realizam testes de detecção. O duplo enriquecimento é uma técnica microbiológica comum que pode prontamente ser introduzida por estes laboratórios, apesar de ser mais demorada e mais trabalhosa que os procedimentos convencionais de cultivo. As técnicas moleculares, por sua vez, já estão se tornando realidade nas agroindústrias, de nosso país, o que permite a introdução de um método sensível e rápido para detecção de salmonela (18 horas, desde a etapa de pré-enriquecimento, até a extração do DNA e o PCR propriamente dito, para obtenção de resultados positivos e negativos).

2) CONCLUSÕES

- O eficiente monitoramento de salmonela em plantéis depende de amostragem freqüente.
- MSRV, procedimento microbiológico mais prático, demonstrou-se menos sensível em relação aos demais procedimentos analisados;
- O duplo enriquecimento demonstrou maior sensibilidade semelhante ao qPCR;
- A qPCR confere vantagens de agilidade e menor complexidade, garantindo especificidade e sensibilidade;
- A combinação dos métodos testados resultou em um significativo incremento de sensibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abef. Disponível em: <http://www.abef.com.br> acesso em 02 de Janeiro de 2007.
- AI-SOUD, W.A.; RADSTROM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied Environmental Microbiology* 64:3748-3753, 1998.
- BACK, A. *Manual de doenças das aves*. Cascavel 61-76, 2002.
- BECKERS, H., *et al.* Fate of *Salmonella* and competing flora in meat sample enrichments and in Muller-Kauffmann tetrathionate medium. *Journal of Applied Bacteriology* 62:97-104, 1987.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 03 de 09 de janeiro de 2002. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livre de *Salmonella Gallinarum* e de *S. Pullorum* e livre ou controlado para *S. Enteritidis* e para *S. Typhimurium*. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 08 de 23 de janeiro de 1995. Método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella*. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1995a.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 126 de 03 de novembro de 1995. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1995b.
- BRAUN, C., KOSTKA, V., BALKS, E., REDMANN, T., HELMUTH, R. Comparative studies of diagnostic bacteriological methods for the recovery of *Salmonella* from faecal samples from flocks of layers. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 45:245-250, 1998.
- BRENNER, F. W., VILLAR R. G., ANGULO, R., TAUXE, R., SWAMINATHAN B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2465-2467, 2000.
- CHARLTON, B.R., WALKER, R.L., KINDE, H., BAUER, C.R., CHANNING-SANTIAGO, S.A., FARVER, T.B. Comparison of *Salmonella* Enteritidis-Specific Polymerase Chain Reaction Assay to Delayed Secondary Enrichment Culture for the Detection of *Salmonella* Enteritidis in Environmental Drag Swab Samples. *Avian Diseases* 49:418-422, 2005.

- De BOER, E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *International Journal of Clinical Microbiology* 45(1):43-53, 1998.
- De MEDICI, D., CROCI, L., DELIBATO, E., DI PASQUALE, S., FILETICI, E., TOTI, L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3456-3461, 2003.
- De SMEDT J.M. and BOLDERDIJK, R.F. Dynamics of *Salmonella* isolation with Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis medium. *Journal of Food Protection* 50:6548-6661, 1987.
- De ZUTTER, L., DE SMEDT, J.M., ABRAMS, R., BECKERS, H., CATTEAU, M., DE BORCHGRAVE, J., DEBEVERE, J., HOEKSTRA, J., JONKERS, F., LENGES, J., NOTERMANS, S., VAN DAMME, L., VANDERMEERSCH, R., VERBRAEKEN, R., WAES, G. Colaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassilidis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology* 13:11-20, 1991.
- DURECKO R., SALADIOVA D., POPELKA P., SIMANSKA I., Epidemiological and epizootological aspects of salmonellosis. *Bratislavské Lekárske Listy* 105(12):414-418, 2004.
- ELLINGSON J. L., ANDERSON J. L., CARLSON S. A., SHARMA V. K., Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Molecular Cell Probes* 18:51-57, 2004.
- FLUIT, A.D.C.; WIDJOJOATMODJO, M.N.; BOX, A.T.A. *et al.* Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immuno-polimerase chain reaction assay. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington 59(5):1342–1346, 1993.
- GUERIN, M. T., MARTIN, S. W., DARLINGTON, G. A., RAJIC, A. A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69:88-99, 2005.
- HOORFAR, J., AHRENS, P., RADSTÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3429-3435, 2000.
- KINDE, H., CASTELLAN, D.M., KASS, P.H., ARDANS, A., CUTLER, G., BREITMEYER, R.E., BELL, D.D., ERNST, R.A., KERR, D.C., LITTLE, H.E., WILLOUGHBY, D., RIEMANN, H.P., SNOWDON, J.A., KUNEY, D.R. The Occurrence and Distribution of *Salmonella enteritidis* and Others Serovars on

- California Egg Laying Premises: A Comparison of Two Sampling Methods and Two Culturing Techniques. *Avian Diseases* 48:590-594, 2004.
- LE MINOR, L. GENUS III Salmonella. Bergey's. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Baltimore: Williams&Wilkins 1:427-458, 1984.
- LAZARO, D.R.,HERNANDEZ,M., ESTEVE, T., HOOFFAR, J., PLA, M. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiology Methods* 54:381-390, 2003.
- LÖFSTRÖM C., KNUTSSON R., AXELSSON C. E., RADSTRÖM P., Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Applied Environmental Microbiology* 70(1):69–75, 2004.
- LOU, Q.; CHONG, S. K; FITZGERALDI, J. F. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1):281-283, 1997.
- MACIOROWSKI, K. G., PILLAI, S. D., JONES, F. T., RICKE S.C., Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. *Critical Reviews in Microbiology* 31:45-53, 2005.
- MALORNY, B., TASSIOS, P. T., RASTRÖM P., COOK, N., WAGNER M., HOOFFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal Food Microbiology* 83:39-48, 2003.
- MALORNY, B., HOOFFAR, J., HUGAS, M., HEUVELINK, A., FACH, P., ELLERBROEK, L., BUNGE, C., DORN, C., HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal Food Microbiology* 89:241-249, 2003.
- MALORNY B., PACCASSONI, E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A., HELMUTH R. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in food. *Applied Environmental Microbiology* 70(12):7046-7052 , 2004.
- MALORNY B., COOK N., D'AGOSTINO M., De MEDICI D., CROCI L., ABDULMAWJOOD A., FACH P., KARPISKOVA R., AYMERICH T., KWAITEK K., HOORFAR J., MARLONY B. Multicenter validation of PCR-based method for detection of *Salmonella* in chicken and pig samples. *Journal AOAC International* 87(4):861-866, 2004.
- MANFIO, L. Métodos para Diagnóstico de *Salmonella* na avicultura. Monografia de Especialização. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, 2003.
- NAM, H. M., SRINIVASAN V., GILLESPIE B. E., MURINDA S. E., OLIVER S. P., Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal Food Microbiology* 102:167-171, 2005.

- NIETFELD, J.C., KELLY, B., DRITZ, S.S., FEDER, I., GALLAND, J.C. d
Comparison of conventional and delayed secondary enrichment for isolation of *Salmonella* spp. from swine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10:285-287, 1998.
- O'DONOGHUE, D., and WINN, E. Comparison of the MSRV method with an in-house conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods. *International Letters in Applied Microbiology* 17:174-177, 1993.
- POPOFF, M.Y. and LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 7th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, France, 1997.
- PORCEAU, S.S. and SPRINGER, W.T. Evaluation of secondary enrichment for detecting salmonellae in bobwhite quail. *Avian Diseases* 22:42-45, 1978.
- RAES, M., VOOGT, N., SCHULTEN, S.M., NAGELKERKE, N., VAN DE GIESSEN, A.W. Vergelijking van methoden voor *Salmonella* isolatie uit pluimveefeces. *De Ware(n)-Chemicus* 29:129-136, 1999.
- READ, S.C. IRWIN, R.J. POPPE, C., HARRIS, J. A comparison of two methods for the isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. *Poultry Science* 73: 1617-1621, 1994.
- RIGBY, C.E. and PETTIT, J.R. Delayed Secondary Enrichment for the Isolation of Salmonellae from Broiler Chickens and Their Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 40:783-786, 1980.
- RYBOLT, M. L., WILLS R. W., BAILEY R. H., Use of secondary enrichment for isolation of *Salmonella* from naturally contaminated environmental samples. *Poultry Science* 84(7):992-997, 2005.
- SEO, K. H., VALENTIN-BOM, I. E., BRACKETT, R. E., HOLT, P. S. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *Journal of Food Protection* 67:864-869, 2004.
- TINDALL B.J., GRIMONT P. A., GARRIT, Y.G.M., EUZEBY J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal System Evolution Microbiology* 55:521-524, 2005.
- VAN DER ZEE, H. Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella* enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* 21:41-46, 1994.
- VOOGT, N., RAES, M., WANNET, W.J.B., HENKEN, A.M., VAN DE GIESSEN, A.W. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology* 32:89-92, 2001.

- WALTMAN, W.D., HORNE, A.M., PIRKLE, C. Use of Delayed Secondary Enrichment for the isolation of *Salmonella* in Poultry and Poultry Environments. *Avian Diseases* 35:35-88, 1991.
- WIDJOJOADMODJO, M.N.; FLUIT, A.C.; TORESMA, R. The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (12):3195-3199, 1992.
- ZDRAGAS, A., TSAKOS, P., MAVROGENI, P. Evaluation of two assays, MSRV and RV, for the isolation of *Salmonella* spp. from wastewater samples and broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology* 31:328-331, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)