ARTIGO DE REVISÃO

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA OS PATÓGENOS ALIMENTARES:
CAMPYLOBACTER SP., *SALMONELLA SP.* E *LISTERIA MONOCYTOGENES*

R.B. de Andrade, T. Gemelli, L.P. Dall Onder, K. Cristina, T. de Brito, A.A.L. Barboza, B.G. de Brito

Instituto de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", Estrada do Conde, 6.000, CEP 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brasil. E-mail: andbink@gmail.com

RESUMO

Os métodos moleculares de detecção rápida e eficaz de lotes de aves infectados por bactérias como *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Listeria monocytogenes* são importantes para reduzir a frequência da transmissão destes patógenos entre os lotes de aves e aos consumidores de produtos de origem animal. Recentemente, as técnicas de biologia molecular, em especial a reação em cadeia polimerase, que permite a amplificação específica de segmentos de DNA, têm possibilitado novos rumos na identificação de bactérias supracitadas, reduzindo o tempo de cultivo e ampliando a confiabilidade das provas diagnósticas. A utilização da biologia molecular por laboratórios de diagnóstico humano e animal, assim como em programas de controle de qualidade de alimentos e produtos de origem animal, já é realidade e tende a se expandir rapidamente. O objetivo deste artigo é fazer uma breve revisão dos testes diagnósticos convencionais e moleculares para identificar *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. Concluindo, o diagnóstico molecular é um campo em avanço científico e tecnológico, no qual novas técnicas moleculares estão em desenvolvimento para o diagnóstico de bactérias em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico, aves, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

DIAGNOSTIC METHODS FOR THE FOOD PATHOGENS *CAMPYLOBACTER SP.*, *SALMONELLA SP.* AND *LISTERIA MONOCYTOGENES*. The molecular methods for quick and efficient detection of chicken lots infected by bacteria such as *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* and *Listeria monocytogenes* is basic for the effort to reduce the frequency of the transmission between chicken lots and to the consumers of poultry products. Recently, the development of techniques involving molecular biology, especially polymerase chain reaction, which allows the specific enlargement of segments of DNA, has been making new procedures possible for the identification of the abovementioned bacteria, reducing the time necessary for the tests and enhancing the reliability of the resulting diagnoses. The use of molecular biology in laboratories for human and animal diagnosis, as well as in quality control programs for foods and products of animal origin is already a reality and has tended to expand quickly. The objective of this article is to present a brief review of the conventional diagnostic and molecular tests for the identification of *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes*. In conclusion, molecular diagnosis is a field undergoing scientific and technological advancement, in which new molecular techniques are under development for the diagnosis of bacteria in foods.

KEY WORDS: Diagnosis, chicken, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUÇÃO

As infecções alimentares representam ainda hoje um sério problema de sanidade pública pela sua frequência elevada, mortalidade e pelo grande número de micro-organismos que podem estar envolvidos em um simples evento epidêmico. Diversos patógenos alimentares são conhecidos por causarem doenças, estando veiculados a alimentos e água, e entre esses sabe-se que as bactérias constituem um

grande grupo de micro-organismos causadores de doenças. A transmissão de muitos patógenos aos seres humanos ocorre pela má conservação dos alimentos, manipulação inadequada e consumo de alimentos crus entre outros. *Salmonella sp.* e *Campylobacter sp.* são os agentes de maior implicação em infecções alimentares e se unem a *Listeria monocytogenes* pela importância das eventuais sequelas (FORTUNA; FRANCO, 2005). O risco microbiológico do consumo de aves e produtos derivados crus inclui contaminação por esses três patógenos alimentares.

O gênero *Salmonella* geralmente causa ataques que envolvem um grande número de pessoas. A *Salmonella* sp. é uma das principais causas de doença de origem alimentar tendo alta frequência em todo mundo, estando associada a prejuízos econômicos, dificuldades comerciais e queda na produção (BARROS, 2002). Na década de 1990, surtos de toxinfecção alimentar foram relatados no Estado do Rio Grande do Sul e, dentre os casos, cerca de um terço foram identificados como provocados por alimentos contaminados com *Salmonella* sp. (KONEMAN *et al.*, 2001).

As campilobacterioses, por outro lado, ocorrem como casos esporádicos, porém o *Campylobacter* sp. é uma bactéria que pode ser transmitida pelo contato direto com animais ou com carcaças de aves contaminadas, pela ingestão de alimentos ou água, por meio de fezes de pessoas com infecção ativa ou por transmissão a grupos de risco. As fontes principais incluem produtos lácteos não pasteurizados, consumo de carnes e produtos de aves mal cozidas, alimentos não cozido que podem sofrer contaminação cruzada com produtos e carnes de aves (YAN *et al.*, 2005). A listeriose causada pela *L. monocytogenes* apresenta distribuição mundial, aparecendo com mais frequência em climas temperados e também nos tropicais (JEYASEKARAN *et al.*, 1996). Pode ocorrer em todas as espécies de animais domésticos, sendo mais comum em ruminantes, coelhos e aves (CORRÊA, 1992). Os indivíduos em condições suscetíveis demonstram altas taxas de contaminação por *L. monocytogenes*. Essa bactéria principalmente intracelular é um patógeno emergente que vem sendo relacionado a diversos surtos de doenças de origem alimentar principalmente por estar presente no trato gastrointestinal dos animais, sendo muito comum a contaminação da carcaça e cortes de carne na etapa de abate ou no processamento incorreto (DEDIOL *et al.*, 2002). A contaminação pode ocorrer em cada etapa da produção de alimentos, iniciando na verificação da matéria-prima, transformação, conservação e consumo final dos alimentos. A ingestão desses patógenos ou das suas toxinas contidas nos alimentos é a causa das infecções gastrointestinais.

Os testes bioquímicos podem apresentar alguma variabilidade em razão da ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica; baixo poder discriminatório em micro-organismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes (GANDRA *et al.*, 2008). A necessidade de vários dias a semanas até os resultados serem obtidos torna-se um problema importante (ROONEY *et al.*, 2004). A busca da metodologia ideal para o diagnóstico das salmoneloses, campilobacterioses e listerioses nos animais, nos alimentos e no homem começou no momento da descrição do micro-organismo, sendo desenvolvidas diversas alternativas de métodos diagnósticos como:

imunoensaios, imunodifusão, aglutinação em látex e hibridização do DNA (BLACKBURN, 1993).

Atualmente há necessidade de técnicas de detecção de infecções que demandem menor tempo de resposta e maior precisão de diagnóstico, principalmente para monitorização da produção animal, fabricação de alimentos e produto final (SANTOS *et al.*, 2001). Portanto, técnicas de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* têm sido usadas como auxílio e podem tornar-se substitutas do processo de diagnóstico convencional (OLIVEIRA *et al.*, 2002). As ferramentas da biologia molecular permitem uma identificação precisa, rápida e com custos reduzidos. Entre essas ferramentas, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a ribotipagem, clonagem e análise de restrição (BARON *et al.*, 1994).

A técnica de PCR vem sendo utilizada para a detecção de diversos micro-organismos, destacando-se *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp. e *Salmonella*. (SANTOS *et al.*, 2001). O objetivo deste artigo é fazer uma breve revisão dos testes diagnósticos convencionais e moleculares para identificar essas três bactérias, como descrito a seguir.

Salmonella sp.

Diagnóstico convencional

A *Salmonella* sp. é mais facilmente isolada de uma amostra de fezes. Entretanto, nas chamadas febres entéricas, uma cultura do sangue é o procedimento mais indicado para revelar o micro-organismo durante as duas primeiras semanas (KONEMAN *et al.*, 2001). A microbiologia convencional utiliza para o diagnóstico: isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica. Para a identificação final da presença de *Salmonella* sp. as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meio sólido, seleção de colônias suspeitas e sorologia são necessárias.

Já no isolamento em meio sólido, alguns ágaros, dentre os vários disponibilizados pelos laboratórios, são indicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o ágar Hektoen, ágar Rambach, MacConkey, verde brilhante suplementado com novobiocina, e o XLT4 (chamado de ágar xilose lisina tergitol 4). Além de seletivos, esse ágaros são meios diferenciais, porque as colônias das bactérias se multiplicam com diferentes características.

Nas etapas de detecção, os testes bioquímicos utilizados apresentam características que nos permitem observar a mudança de pH e alteração de coloração dos meios de cultura, quando houver crescimento bacteriano. O meio SIM (*Sulphur Indol Motility*) determina se os micro-organismos têm motilidade ou não, sendo positivo para a *Salmonella* sp. Na presença de *Salmonella* sp. o meio TSI (*Triple Sugar Iron*) apresenta bisel alcalino com produção

de gás positiva ou negativa e o meio LIA (*Lysine Iron Agar*) mostra-se alcalino na base e com ou sem presença de gás H₂S. O caldo ureia apresenta reação de urease-negativa para a presença de *Salmonella* sp. A interpretação dos resultados dos testes é realizada após a incubação a 37° C por 24 horas. As colônias que apresentarem a leitura dos testes bioquímicos preliminares compatíveis com *Salmonella* sp. passam pela caracterização bioquímica definitiva com testes para utilização do citrato e malonato, desidrolação da arginina, transformação da fenilalanina, descarboxilação da lisina e ornitina, fermentação de carboidratos, prova de Voges-Proskauer e prova do vermelho de metila. Para confirmação do perfil esperado para *Salmonella* sp., prossegue-se a caracterização antigênica com soro antissomático O polivalente de *Salmonella* sp, a identificação final de sorovar, é realizada pelos laboratórios credenciados ou de referência (BRASIL, 1995). No isolamento de salmonelas oriundas de amostras clínicas alguns fatores podem interferir como: administração de antimicrobianos que podem retardar o seu crescimento, como a competição com outros micro-organismos, e a sua eliminação de maneira intermitente em baixo número (STONE *et al.*, 1994a).

Essa metodologia tradicional ou microbiologia convencional para detecção de *Salmonella* sp. requer no mínimo quatro dias para obtenção de resultado negativo. As indústrias de alimentos necessitam de resultados em menor tempo para reduzir a estocagem de produtos e custos associados, assim, métodos rápidos para detecção de *Salmonella* sp., por exemplo, o ensaio imunoenzimático – ELISA são utilizados com frequência por causa do seu benefício de detecção rápida e eficiente (FLOWERS *et al.*, 1988).

Na realização do ELISA, têm sido utilizados anticorpos policlonais e monoclonais, que detectam grande parte dos sorovares de *Salmonella* sp., sendo que alguns destes ensaios são disponibilizados comercialmente em forma de kits prontos para o uso. Os kits possuem diferentes especificidades e sensibilidades na detecção de *Salmonella* sp., por causa da ocorrência de resultados falsos negativos (resultados que se apresentam positivos na metodologia tradicional) e resultados falsos positivos (no qual apresentam negativos na metodologia tradicional) influenciados por fatores referentes aos componentes do kit, às amostras e micro-organismos pesquisados (BEUMER *et al.*, 1991). Portanto, o teste de ELISA aparece como uma alternativa diagnóstica, entretanto, devido à ocorrência de resultados que não estão de acordo com a microbiologia convencional, esse teste diagnóstico permanece incerto na detecção de *Salmonella* sp.

Diagnóstico molecular

Entre os métodos utilizados para a identificação de *Salmonella* sp. destacam-se a caracterização

bioquímica, sorotipagens, suscetibilidade a antimicrobianos e sorologia que, embora apresentem alta confiabilidade, requerem um longo tempo para a identificação do micro-organismo (RALL *et al.*, 2005). A análise por PCR diminui o tempo de identificação e detecção da salmonelose, de dias para poucas horas, auxiliando as análises de rotina de laboratórios clínicos e industriais, facilitando também a detecção de organismos não adaptados ao cultivo convencional (RAHN 1992; COHEN, 1993).

Por ser uma técnica altamente específica, a PCR pode ser realizada utilizando o DNA cromossomal ou mesmo o DNA plasmidial, sendo assim possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie (DOUBLET *et al.*, 2008).

Devido ao fato da PCR detectar uma região única num a maioria das cepas, codificar para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros micro-organismos (STONE *et al.*, 1994b). Entre os iniciadores utilizados para detecção de salmonelas encontram-se *invA*, IS200, *hin*, *H-li*, *iagAB*, *spvR*, *viaB*, *mkfA*, *ompC*, *oriC*, tendo estes iniciadores a especificidade como a principal diferença. Como exemplo é possível citar que o gene *invA* estaria presente nas espécies *S. enteria* e *S. bongori*, enquanto o gene *iagAB* identificaria apenas os sorovares *S. enterica* subespécie I (BAUMLER *et al.*, 1997).

HOORFAR *et al.* (1999) relataram que a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica. Segundo GÁLÁN *et al.* (1992), o *invA* é um gene de *Salmonella* sp. que codifica uma proteína de invasão celular, sendo muito conservado dentro do gênero *Salmonella* e, portanto, muito utilizado nos laboratórios. SANTOS *et al.* (2001) avaliaram a especificidade, seletividade e sensibilidade de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 159 (5'-GT-GAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA3') e 141 (5'-TCATCGCACACGTCAAAGGACC3') derivados do gene *invA* na detecção de nove culturas-padrão de *Salmonella*, obtendo uma amplificação de DNA com aproximadamente 284pb em todas as amostras analisadas. Resultados semelhantes foram obtidos por RAHN *et al.* (1992) ao realizarem ensaios de especificidade e seletividade com iniciadores derivados deste gene em 630 amostras de salmonelas, de 21 gêneros. A associação dos iniciadores derivados dos genes *invA* e *invB* elimina a possibilidade da ocorrência de falsos-negativos, elevando assim a especificidade da PCR (STONE *et al.*, 1994b).

TUCHILLI *et al.* (1995), utilizando tecidos de pintos infectados com *Salmonella* sp., demonstraram que a sensibilidade da PCR foi maior do que no isolamento bacteriano em amostras com infecções na fase inicial, intermediária e tardia, demonstrando-se ainda muito

eficaz para infecções latentes. HUDSON *et al.* (2000) analisaram a virulência das salmonelas de aves silvestres e atribuíram a presença do gene de invasão *invA* em todas as amostras pesquisadas. A utilização da PCR na detecção de salmonela em carnes, fezes, tecidos, sangue e leite é uma estratégia muito utilizada, SCHRANK (2000) ressalta a alta sensibilidade e especificidade desta técnica para a identificação de *Salmonella* em produtos agrícolas.

O gene-alvo *ompC* é citado para a detecção de *Salmonella* sp., e os genes-alvo *Sdfl*, *ViaB* e *Spy* na identificação de *Salmonella enterica enterica* sorotipo Enteridis, Typhi e Typhimurium, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2006; ALVAREZ *et al.*, 2004).

Um dos fatores limitantes para a detecção de agentes microbianos através da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais, é a presença de substâncias as quais inibem ou reduzem a eficiência da amplificação como sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteínas no leite e ureia na urina; por este motivo diferentes técnicas são empregadas para diminuir a inibição da PCR e/ou para separar as bactérias dos inibidores da PCR (AL-SOUD; RADSTRÖM, 1998). Alguns fatores que podem inibir a eficiência da PCR podem ser reduzidos através da extração do DNA de *Salmonella* sp. que utilizam fenol-clorofórmio principalmente durante a extração de DNA total, apresentando assim resultados satisfatórios na análise de amostras com vários interferentes (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

Campylobacter sp.

Diagnóstico convencional

O isolamento do agente é o procedimento mais indicado para diagnosticar a campylobacteriose, no entanto, o *Campylobacter* sp. é encontrado normalmente em baixas concentrações nos espécimes analisados, exceto em carcaças de aves recentemente processadas (CARVALHO *et al.*, 2002). No diagnóstico de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são utilizadas fezes, conteúdo cecal e da cloaca, jejuno e também fígado. O meio de cultura mais utilizado é o ágar base campylobacter incubado por 36 a 48 horas à 42° C, em microaerobiose e na identificação do agente encontra-se bastonete delgado e curvo, Gram negativo, colônia translúcida de gotas d'água, lisa, convexa, brilhante e o crescimento pode ser confluyente.

O isolamento é confirmado com aglutinação em látex e os testes bioquímicos para *C. jejuni* são: oxidase positiva, urease negativo, TSI negativo (fermentação e produção de gás sulfídrico ausente) e hidrólise do hipurato de sódio positivo (REVOLLEDO, 2009). Para manutenção das amostras, a utilização de ambientes livres de oxigênio (100% N₂), adicionados de 0,01%

de bissulfito de sódio sob refrigeração, pode aumentar em até 100 vezes o tempo de estoque viável do agente, quando comparado com o armazenamento a 25° C, mantido as mesmas condições (AMERICAN..., 2001). Não se recomenda o uso de velas para gerar ambiente microaerófilo; dá-se preferência à extração do gás atmosférico com uso de bomba a vácuo e posterior introdução de uma combinação de gases, armazenados em cilindros (CHRISTOPHER *et al.*, 1982). A técnica de plaqueamento direto é mais eficiente para quantificar *Campylobacter* sp. em carcaças de aves do que o método de número mais provável – NMP (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). Nas pesquisas qualitativas em superfícies de equipamento e utensílios envolvendo um grande número de amostras, dá-se preferência à técnica do suabe. Com o auxílio de um bastão embebido em meio de cultura, faz-se esfregaço sobre a superfície da amostra, retornando-o para o caldo ou dispensando o material nele contido diretamente em ágar seletivos (AMERICAN..., 2001).

O isolamento de *C. jejuni* de alguns alimentos e de água pode ser facilitado utilizando uma fase de pré-enriquecimento com incubação por 4 horas a 37° C em meio não-seletivo antes da incubação a 42° C (BARNES *et al.*, 1997). Em meios com alta umidade, as colônias tendem à coalescência, dificultando a contagem, embora essa seja uma característica importante apresentada pelo gênero nos cultivos em meios sólidos. Para a obtenção de meios mais secos, pode-se deixar as placas por uma noite em temperatura ambiente, em ausência de luz, ou introduzir papel filtro adicionado de glicerol no ambiente de incubação das placas (HUNT *et al.*, 2001). No primeiro isolamento, observam-se colônias translúcidas, acinzentadas, tendendo à coalescência, podendo ser rasas, opacas e marrom-acinzentadas com discreta margem delimitada (AMERICAN..., 2001). A morfologia e a motilidade devem ser observadas em microscopia de campo escuro ou de contraste de fase. *C. jejuni* em cultivo apresenta-se curvo, em forma de “s” ou em bastonete espiralado; variam entre 0,2 e 1 mcm de diâmetro e entre 0,5 e 5 mcm de comprimento, com movimentos em saca-rolha. Deve-se sempre observar que em culturas velhas podem apresentar formas cocoides e não-móveis.

Utiliza-se para colorações a fucsina de Ziehl-Neelsen, que obteve resultados melhores do que com a safranina (HUNT *et al.*, 2001). No isolamento, transfere-se uma colônia para o HIA-RB (*heart infusion agar plates supplemented with 5% defibrinated rabbit blood*), incubado a 42° C, em microaerofilia, por 24 horas. Rotineiramente, são utilizados os testes de catalase, redução de nitrato, utilização da glicose, produção de gás sulfídrico, tolerância à glicina e ao cloreto de sódio, capacidade de multiplicação nas temperaturas de 25° C e 42° C, resistência a antimicrobianos, prova do TMAO (*Trimethylamine n-oxide*)

e hidrólise do hipurato. Por meio de hemaglutinação passiva, identificaram 60 sorotipos de *C. jejuni*, e constataram que este e *C. coli* apresentam antígenos diferentes com baixa correspondência entre si (BOHRER *et al.*, 1987).

Diagnóstico molecular

A rapidez na identificação do agente etiológico através da detecção do seu material genético, em comparação aos métodos bacteriológicos, faz com que a técnica de PCR se torne uma alternativa prática aos laboratórios de diagnóstico, uma vez que este método elimina o tempo de incubação, isolamento e testes bioquímicos em micro-organismos de crescimento fastidioso, com poucas características bioquímicas para identificação, como é o caso das bactérias do gênero *Campylobacter* (ON ; HARRINGTON, 2001; MORENO, 2001). A extração de DNA das amostras é obtida das fezes e da cloaca e sua acurácia depende dos métodos de pré-enriquecimento e isolamento direto, indicando que esses dois métodos podem ser utilizados para extração de DNA, pois permitem uma multiplicação considerável do patógeno (KUANA *et al.*, 2008). Um fator muito importante para adoção das metodologias moleculares para *Campylobacter* sp. é a ausência de metodologia padronizada e seu difícil cultivo (HIETT *et al.*, 2002).

A capacidade de identificação e diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* é importante para se obter a fonte de inóculo e identificar as vias de transmissão (FROST, 2001; WASSENAAR; NEWELL, 2000). Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR são capazes de distinguir entre uma ou mais combinações de espécies já descritas de *Campylobacter* termotolerantes (AL RASHID *et al.*, 2000; CHUMA *et al.*, 2000; CLOAK; FRATAMICO, 2002).

As técnicas moleculares podem ser realizadas rapidamente e são relativamente baratas mas, infelizmente, muitas dessas que estão disponíveis atualmente para *Campylobacter* sp. sofrem com a falta de sensibilidade ou especificidade, que pode ser suprida através da combinação de amplificações por PCR e clivagens destes amplicons por enzimas de restrição (HURTADO; OWEN, 1997; FERMER; ENGVALL, 1999; OLIVE; BEAN, 1999; GORKIEWICZ *et al.*, 2003; ON; JORDAN, 2003).

O uso pareado dessas técnicas amplia consideravelmente a possibilidade de caracterizar as cepas genotipicamente, sendo que os critérios de aceitação desses protocolos estão baseados na capacidade de discriminar diferentes clones, na confiabilidade dos resultados no âmbito interlaboratorial, na praticidade, no custo e na possibilidade de identificar isolados e agrupá-los de acordo com sua importância epidemiológica (GOMES *et al.*, 2006). Os genes utilizados com frequência no diagnóstico molecular das espécies de *Campylobacter* sp., devido a sua alta

especificidade, são *HIP*, codificador da hipuricase, e *flaA*, que codifica a flagelina (GOMES *et al.*, 2006).

Microarranjos (*microarray*) espécie-específicos já foram descritos para uma rápida identificação de *Campylobacter* spp. (KERAMAS *et al.*, 2003; VOLOKHOV *et al.*, 2003). Este método apresenta grande potencial para estudos epidemiológicos mas, dado ao custo da tecnologia empregada e às dificuldades para a implantação do *microarray*, na maioria dos laboratórios clínicos, atualmente não têm sido utilizados nas análises de rotina (KLENA *et al.*, 2004).

KLENA *et al.* (2004), visando suprir as dificuldades encontradas durante as análises laboratoriais de *Campylobacter* spp., desenvolveram a PCR multiplex, baseada na sequência de diferentes nucleotídeos do gene *lpxA*, para distinguir entre *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, sendo este método rápido, sensível e específico.

Listeria monocytogenes

Diagnóstico convencional

Na microbiologia tradicional, diversos caldos seletivos de enriquecimento e ágar disponíveis para recuperação e multiplicação de *L. monocytogenes* a partir de espécimes ambientais e de alimentos. Além disso, são necessários vários testes bioquímicos para a classificação taxonômica dos isolados e confirmação do gênero para a identificação da espécie. No mercado está presente uma grande variedade de kits para realizar testes bioquímicos a partir de culturas puras, tornando a identificação simples e rápida (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

Uma técnica muito utilizada é a de enriquecimento a frio que é baseada na taxa de recuperação de bactérias em temperaturas de 4° C, entretanto, apesar de essa técnica ter sido útil, o prolongado tempo de incubação necessário para a obtenção de resultados foi sua principal desvantagem, especialmente em situações de surto, o que veio a estimular a utilização de testes antimicrobianos com meios seletivos. O meio para o enriquecimento deve ser escolhido considerando o tipo da amostra em teste, a qualidade e quantidade do agente possivelmente presente e o tipo de microbiota acompanhante, ou seja, os meios de cultura poderão variar de acordo com a natureza da amostra a ser analisada.

O diagnóstico da listeriose causada pela *L. monocytogenes* inicia pela obtenção de amostras das fezes, medula, sangue e cérebro provenientes das aves ou do meio ambiente. Os meios de culturas utilizados são ALOAgar, BCM *L. monocytogenes*, CHROMagar, ágar PALCAM, ágar Oxford, ágar sangue, ágar sangue com telurito de potássio 0,05%. Para identificação dessa bactéria devemos observar: bacilo em célula única ou cadeia curta, Gram positivo β-hemolítico na coloração, colônia branca,

lisa em ágar sangue e não há crescimento em meio sólido no ágar MacConkey (NORTON *et al.*, 2000). Os testes bioquímicos são observados: não reduz nitrato, fermentação de açúcar: ramnose positivo, α -metil-D-manosídeo positivo, xilose negativo, ribose negativo, amido solúvel negativo. As amostras podem ser multiplicadas em embriões de galinha de 10 dias de idade inoculadas via saco alantóide (REISSBRODT, 2004).

Diagnóstico molecular

As indústrias de alimentos necessitam de metodologias rápidas e sensíveis para monitorar a incidência de *L. monocytogenes*, principalmente em razão do fato das técnicas convencionais de isolamento e identificação de *Listeria* necessitarem de etapas trabalhosas e de longa duração, o que muitas vezes pode levar semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos, contradizendo a urgência do controle epidemiológico (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). Nas últimas décadas, a utilização das técnicas de PCR na detecção e identificação de *L. monocytogenes* tem se demonstrado eficiente, segundo vários trabalhos (MCGINNIS, 2006).

Técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas na caracterização de *L. monocytogenes*, como, por exemplo, PCR, análise por enzimas de restrição (REA), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise randômica do DNA polimórfico (RAPD), tipificação ribossomal, imuno-cromatografia, fluorescência e sequenciamento de bases nucleotídicas ou aminoácidos; é válido ressaltar que a análise dos produtos das reações também é de grande importância para a fidelidade do diagnóstico como, por exemplo, a utilização da eletroforese em gel de agarose e a hibridização em fase sólida (REISSBRODT, 2004).

A utilização da técnica de PCR Multiplex, com mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de várias sequências de DNA, o que contribui para a identificação do gênero *Listeria* e a confirmação de espécies como, por exemplo, a utilização do gene *iap*, neste tipo de técnica de PCR, para diferenciação das espécies patogênicas (BUBERT, 1999).

BYUN *et al.* (2001) utilizaram a técnica de RAPD para tipificar *L. monocytogenes* isolada de carnes na Coreia, e puderam concluir que esta técnica auxilia nos trabalhos epidemiológicos de *L. monocytogenes*, além de outros micro-organismos. A PCR em tempo real (Real-time PCR) obteve bom desempenho para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* e *Listeria innocua*, segundo RODRÍGUEZ-LÁZARO (2009). Portanto, métodos moleculares de identificação, caracterização e análise da variabilidade vêm sendo muito utilizados na ampliação de conhecimentos sobre as características moleculares dos micro-organismos.

Em estudo realizado com a técnica de PCR da

proteína associada com virulência (p60) do gene *iap* em 48 cepas de *Listeria* spp. isoladas de diferentes tipos de alimentos, COCOLIN *et al.* (2002), utilizando cinco pares de *primers* específicos, pode diferenciar estas cepas em cinco espécies (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*). LONG *et al.* (2008) desenvolveram e padronizaram a Q-PCR para detectar e quantificar *L. monocytogenes* através da detecção do gene *hly*, responsável pela produção da listeriolisina O. De acordo com estes autores, além da rápida detecção, esse método permitiu a quantificação de *L. monocytogenes* o que pode ser útil para verificar a presença deste patógeno tanto no diagnóstico clínico como em alimentos.

CONCLUSÃO

Os micro-organismos estudados são de grande importância quando nos referimos aos transtornos alimentares. Por essa razão, técnicas que apresentem um diagnóstico preciso e eficiente são cada vez mais necessárias para evitar surtos de infecções, que envolvem danos à saúde pública e altos custos. O diagnóstico tradicional, envolvendo os métodos analíticos oficiais para determinação da sanidade de alimentos, principalmente no Brasil, ainda continua sendo realizado por longo período, devido ao fato de ser eficiente. Entretanto, as técnicas moleculares estarão sendo utilizadas com mais frequência com o decorrer dos tempos, a sua utilização vem contribuir com as técnicas tradicionais proporcionando, assim, diagnósticos cada vez mais precisos e em curto prazo de tempo. Assim, podemos ressaltar que o diagnóstico molecular é um campo em franco avanço científico e tecnológico, no qual novas técnicas moleculares estão em desenvolvimento para o diagnóstico de bactérias em alimentos.

AGRADECIMENTO

À FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e ao Programa subvenção/Pesquisador na Empresa, pelo apoio financeiro ao projeto nº 01/08/031900.

REFERÊNCIAS

- AL RASHID, S.T.; DAKUNA, I.; LOUIE, H.; NG, D.; VANDAMME, P.; JOHNSON, W.; CHAN, V.L. Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the *glyA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.1488-1494, 2000.
- AL-SOUD, W.A.; RADSTRÖM, P. Capacity of nine

- thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.10, p.3748-3753, 1998.
- ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A.B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.4, p.1734-1738, 2004.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4.ed. Washington, DC: APHA, 2001.
- BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; BEARD, C.H.; McDOGALD, L.R.; SAIF, Y.M. *Diseases of poultry*. 10.ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1997. p.235-245.
- BARON, E.J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. *Diagnostic microbiology*. 9.ed. St. Louis: Mosby, 1994. 958p.
- BARROS, V.R.M. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. *Higiene Alimentar*, v.16, n.94, p.15-19, 2002.
- BAUMLER, A.J.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.1224-1230, 1997.
- BENNET, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p.437-441, 1998.
- BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. *International Journal of Food Microbiology*, v.12, p.363-374, 1991.
- BLACKBURN, C.W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. A review. *Journal of Applied Bacteriology*, v.75, p.199-214, 1993.
- BOHRER, L.; FILARDI, S.; SIMON, F.; IKUNO, A. A.; MUELLER, K. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em capivaras (*Hydrochoeris hydrochoeris*, LIN.). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.54, n.1/4, p.45-48, 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 8 de 23 de janeiro de 1995. Aprova alterações introduzidas no método analítico de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella*. *Diário Oficial da União*, 27 jan. 1995. Seção I, p.1182.
- BUBERT, A. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based in Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.10, p.4688-4692, 1999.
- BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, v.10, p.86-876, 2004.
- BYUN, S.K.; JUNG, S.C.; YOO, H.S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.69, p.227-235, 2001.
- CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. *Higiene Alimentar*, v.16, p.89-94, 2002.
- CHRISTOPHER, F.M.; SMITH, C.G.; VANDERZAN, T.C. Examination of poultry giblets, raw milk and meat for *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Journal of Food Protection*, v.45, p.260-262, 1982.
- CHUMA, T.; HASHIMOTO, S.; OKAMOTO, K. Detection of thermophilic *Campylobacter* from sparrows by multiplex PCR: the role of sparrows as a source of contamination of broilers with *Campylobacter*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.62, p.121-1295, 2000.
- CLOAK, O.M.; FRATAMICO, P.M. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Protection*, v.65, p.266-273, 2002.
- COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.12, p.6273-6282, 2002.
- COHEN, N.D.; NEIBERGS, H.L.; McGRUDER, E.D.; WHITFORD, H.W.; BEHLE, R.W.; RAY, P.M.; HARGIS, B.M. Genus-specific detection of *Salmonellae* using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.5, p.368-371, 1993.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843p.
- DEDIOL, C.; NACIF, N.J.; ANDRÉ, S.; SÁNCHEZ, M.L.; ACOSTA, M.V.; SFREDDO, S.E. Incidência de *Listeria monocytogenes* en carne vacuna fresca en el Área del Gran Mendoza. *Higiene Alimentar*, v.16, n.102/103, p.13-16, 2002.
- DOUBLET, B.; DOUARD, G.; TARGANT, H.; MEUNIER, D.; MADEC, J.Y.; CLOECKAERT, A. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of

- chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods*, v.75, n.2, p.359-361, 2008.
- FERMEYER, C.; ENGVALL, E.O. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.330-337, 1999.
- FLOWERS, R.S.; KLATT, M.J.; KEELAN, S.L. Visual immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.71, n.5, p.973-980, 1988.
- FORTUNA, J.L.; FRANCO, R. Epidemiologic studies of the *Salmonella*, as casual of infections food. *Higiene Alimentar*, v.19, n.128, p.33-44, 2005.
- FROST, J. A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p.8S-95S, 2001.
- GÁLÁN, J.E.; GINNOCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology*, v.174, n.13, p.4338-4339, 1992.
- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOL, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum Technology*, v. 30, p.109-118, 2008.
- GOMES, F.R.; CURCIO, B. ; LADEIRA, S.R.L.; FERNÁNDEZ, H.; MEIRELES, M.C.A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small Properties in Pelotas, southern of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.375-378, 2006.
- GORKIEWICZ, G.; FEIERL, G.; SCHÖBER, C.; DIEBER, F.; KÖFER, J.; ZECHNER, R.; ZECHNER, E.L. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p.257-2546, 2003.
- HIETT, K.L.; COX, N.A.; STERN, N. Direct Polymerase Chain Reaction Detection of *Campylobacter* spp. In Poultry Hatchery Samples. *Avian Diseases*, v.46, n.1, p.219-223, 2002.
- HOCHBERG, A.M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W.M. ROZINSKI, P.M. Sensitivity and specificity of the BAX® for screening *Listeria monocytogenes* assay. Internal validation and independent laboratory study. *Journal of AOAC International*, v.84, n.4, p.108-1097, 2001.
- HOORFAR, J.; BAGGESEN, D.L.; PORTING, P.H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, v.35, p.7-84, 1999.
- HUDSON, R.C.; QUIST, C.; LEE, M.D.; KEYES, K.; DODSON, S.V.; MORALES, C.; SANCHEZ, S.; WHITE, D.G.; MAURER, J.J. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.5, p.1860-1865, 2000.
- HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter* In: *Bacteriological manual online*. 8.ed. Revision A. Washington, DC: Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA, 2001. cap. 7.
- HURTADO, A.; OWEN, R.J. A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.241-2404, 1997.
- JEYASEKARAN, G.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Incidence of *Listeria* spp. in tropical fish. *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p.333-340, 1996.
- KERAMAS, G.; BANG, D.D.; LUND, M.; MADSEN, M.; RASMUSSEN, S.E.; BUNKENBORG, H.; TELLEMAN, P.; CHRISTENSEN, C.B.V. Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Molecular Cell Probes*, v.17, p.187-196, 2003.
- KLENA, J.D.; PARKER, C.T.; KNIBB, K.; IBBITT, J.C.; DEVANE, P.M.; HORN, S.T.; MILLER, W.G.; KONKEL, M.E. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.559-5557, 2004.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; KELLERMANN, A.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, n.1, p.21-24, 2008.
- KUMAR, S.; BALAKRISHNA, K.; BATRA, H.V. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. *Letters in Applied Microbiology*, v.42, n.2, p.149-154, 2006.
- LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of Bacteriology*, v.174, n.15, p.5072-5078, 1992.
- LONG, F.; ZHU, X.; ZHANG, Z.; SHI, X. Development of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Method Using a Live Bacterium as Internal Control for the Detection of *Listeria monocytogenes*. *Diagnostic Microbiology*

and *Infectious Disease*, v.12, p.1-8, 2008.

McGINNIS, L. *New Methods for Detecting Listeria*. In: U.S. Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/pr/2006/061012.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2010.

MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; FÉRRUS, M.A.; ALONSO, J.L.; BOTELLA, S. Direct detection of thermotolerant *Campylobacters* in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Revista de Microbiologia*, v.152, p.577-582, 2001.

NORTON, D.M.; McCAMEY, M.; BOOR K.J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX® for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. *Journal of Food Protection*, v.63, n.3, p.343-346, 2000.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, v.87, p.25-35, 2002.

ON, S.L.W.; HARRINGTON, C.S. Evaluation of numerical analysis of PFGE DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p.285-293, 2001.

ON, S.L.W.; JORDAN, P.J. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.330-336, 2003.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; McEWE, S.A.; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C.L. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, v.6, p.271-279, 1992.

RALL, V.L.M.; RALL, R.; ARAGON, L.C.; SILVA, M.G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.2, p.147-150, 2005.

REISSBRODT, R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. – an overview. *International Journal of Food Microbiology*, v.95, p.1-9, 2004.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA A.J.P. *Patologia aviária*. Manole: Barueri, 2009. p.34-66.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. Quantitative detection of

Listeria monocytogenes and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02482* targets and amplifluor technology. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.3, p.1366-1377, 2009.

ROONEY, R.M.; CRAMER, E.H.; MANTHA, S.; NICHOLS, G.; BARTRAM, J.K.; FARBER, J.M.; BENEMBAREK, P.K. A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. *Public Health Reports*, v.119, n.4, p.427-434, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

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

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; PONTES, A.P.; FLORES, M.L.; FORELL, F.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Protocolos para extração de DNA de *Salmonella*. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.27, n.2, p.93-101, 1999.

SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; PIATTI, R.M.; CAMPOS, F.R.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, M.V.; FRANCISCO, W.; RICHTZENHAIN, L.J.; GENOVEZ, M.E. Emprego da técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação da polimerase em cadeia (PCR) do gene *FLA* na subtipagem de amostras de *Campylobacter jejuni* subesp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e humanos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.1, p.1-5, 2003.

SCHRANK, I.S. Aplicação de método baseado em PCR para a detecção de *Salmonella* em produtos da indústria avícola e em amostras clínicas. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, p.105S, 2000.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.7, p.1742-1749, 1994a.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; GALLAND, J.; CURTIS, R.; KELLY, S.M.; CHEMGAPPA, M. Detection of *Styphimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.5, p.1292-1295, 1994b.

TUCHILLI, L.M.; KODAMA, H.; IZUMOTO, Y.; MUKAMOTO, M.; FUCATA, T.; BABA, T. Detection of *Salmonella Gallinarum* and *S. Typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.1, n.57, p.59-63, 1995.

VOLOKHOV, D.; CHIZHIKOV, V.; CHUMAKOV, K.; RASOOLY, A. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.4071-4080, 2003.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, v.345, p.63-67, 1990.

WASSENAAR, T.M.; NEWELL, D.G. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.1-9, 2000.

YAN, S.; PENDRAK, M.; FOLEY, S.; POWERS, J. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.5, p.285-305, 2005.

Recebido em 17/6/09

Aceito em 21/7/10