

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

**FABÍOLA FATIMA DAS CHAGAS**

**OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP. EM CARCAÇAS DE  
FRANGO E AMOSTRAS AMBIENTAIS EM DOURADOS-MS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS**

**JULHO/2011**

**FABÍOLA FATIMA DAS CHAGAS**

**OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP. EM  
CARÇAÇAS DE FRANGO E AMOSTRAS  
AMBIENTAIS EM DOURADOS-MS**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Mari Pires de Oliveira**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexeia Barufatti Grisolia**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia, na área de concentração Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS**

“Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras.”

Reinhold Niebuhr (1862-1971).

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Trecho do livro “O encontro marcado” de Fernando Sabino.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus abençoados pais, Jucelino e Maria Helena, por haverem aceitado a missão de me receber como filha e a de me guiar na Terra até eu conquistar a capacidade de traçar meus próprios caminhos, e a minha esposa Marli pelo amor, compreensão e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de estar reencarnada na Terra dando continuidade ao processo evolutivo do meu espírito.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Mari Pires de Oliveira pela dedicação, paciência e conhecimentos ofertados.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexeia Barufatti Grisolia pela colaboração e orientação essencial em Biologia Molecular.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Martha Graton Mikcha pela colaboração e enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno por haver concedido espaço no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal/FCA para o desenvolvimento da pesquisa e pelo incentivo.

Ao mestrando em Biologia Geral – Bioprospecção, Bruno do Amaral Crispim, cuja ajuda, conhecimentos e treinamento foram determinantes para a execução e conclusão do projeto.

Aos técnicos de laboratório Fabiana, Juliana e Marquinhos da FCBA/UFGD, pelo auxílio prestado.

À técnica de laboratório Jackeline da FCA/UFGD, pelo acompanhamento e esclarecimento de dúvidas.

Ao Johnes A. Santana, diretor da Vigilância Sanitária de Dourados à época do desenvolvimento da pesquisa, pela colaboração e intermediação com a médica veterinária Joyce Hisayama do Grupo ABV.

À Joyce Hisayama, médica veterinária do Grupo ABV, pelo auxílio e interesse nessa pesquisa e ao Grupo ABV pela doação das carcaças de frango.

Ao 1º Ten QOPM Anderson Machado Padilha e à 2º Ten QOPM Letícia Raquel Lopes Ramos, meus superiores imediatos durante o período de mestrado, pela compreensão com relação aos meus horários de trabalho, permitindo-me conciliar trabalho e estudo.

À FUNDECT, pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - Nomenclatura atual de <i>Salmonella</i> .....	12
<b>TABELA 2</b> – Características típicas de crescimento de <i>Salmonella</i> em meios seletivos e diferenciais comumente utilizados.....	21
<b>TABELA 3</b> – Reatividade bioquímica de <i>Salmonella</i> .....	22

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR multiplex para determinação das cepas do gênero *Salmonella* (gene *invA*, 284 pb) e identificação dos sorotipos Enteretidis (gene *sefA*, 250 pb) e Typhimurium (gene *fliC*, 620 pb) em cepas de carcaça de frango..... 43
- FIGURA 2** – Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR multiplex para determinação das cepas do gênero *Salmonella* (gene *invA*, 284 pb) e identificação do sorotipos Enteretidis (gene *sefA*, 250 pb) e Typhimurium (gene *fliC*, 620 pb) em cepas de água de piscicultura..... 43
- FIGURA 3** – Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR para determinação de limiar de reação positiva do gene *invA* (284 pb) específico para o gênero *Salmonella*..... 44

## RESUMO

A salmonelose é uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos e água contaminados devido ao número de pessoas afetadas anualmente e à conseqüente necessidade de gastos públicos para tratamentos médico-hospitalares e do reprocessamento e/ou destruição de alimentos contaminados. No presente trabalho isolaram-se cepas de *Salmonella* sp. de carcaças de frango e amostras de água de piscicultura através de métodos de cultura convencionais. Posteriormente, padronizou-se PCR multiplex, utilizando-se *primers* específicos dos genes *invA*, *fliC* e *sefA*, para a simultânea confirmação do gênero *Salmonella* e a detecção dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis das cepas isoladas. De 50 amostras de carcaças de frango, por meio de PCR multiplex, verificou-se índice de 90% de contaminação, sendo confirmadas 66 cepas de *Salmonella*, dentre as quais 28 (42,42%) foram detectadas como *Salmonella* Enteritidis, não havendo detecção de *Salmonella* Typhimurium. De 15 amostras de água de piscicultura, 73,33% foram confirmadas como *Salmonella* sp. e não foi detectada a presença dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis. A PCR multiplex padronizada mostrou-se bastante sensível e pode ser empregada como alternativa aos testes bioquímicos e sorológicos, permitindo a rápida e confiável confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

**Palavras-chave:** Amostras Ambientais, Carcaça de Frango, *Salmonella* sp., PCR Multiplex, *invA*, *fliC*, *sefA*.



## ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most important diseases transmitted by contaminated food and water due to the number of people affected annually and the consequent need of public spending for medical and hospital treatment and reprocessing and/or destruction of contaminated food. In this study it was isolated strains of *Salmonella* sp. from chicken carcasses and water samples from fish farming by conventional culture methods. Later, it was standardized multiplex PCR, using specific primers from the genes *invA*, *fliC* and *sefA* for the simultaneous confirmation of the genus *Salmonella* and detection of the serotypes Typhimurium and Enteritidis from the strains isolated. From 50 samples of chicken carcasses, by multiplex PCR, it was verified a rate of 90% contamination, being confirmed 66 strains of *Salmonella*, among which 28 (42.42%) were identified as *Salmonella* Enteritidis, with no detection of *Salmonella* Typhimurium. From 15 water samples from fish farming, 73.33% were confirmed as *Salmonella* sp. and it was not detected the presence of serotypes Typhimurium and Enteritidis. The standardized multiplex PCR proved to be highly sensitive and it can be used as an alternative to biochemical and serological tests, enabling rapid and reliable confirmation of the genus *Salmonella* and serotypes Enteritidis and Typhimurium.

**Keywords:** Environmental Samples, Chicken Carcasses, *Salmonella* sp. Multiplex PCR, *invA*, *fliC*, *sefA*.

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. O gênero <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Características.....	9
1.1.2. Classificação e nomenclatura.....	10
<b>1.2. Epidemiologia de <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. <i>Salmonella</i> isolada de amostras ambientais.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4. <i>Salmonella</i> isolada de amostras de frango.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5. Legislação aviária.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6. Sorotipos Enteritidis e Typhimurium.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7. Métodos de tipificação fenotípicos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.8. Detecção, identificação e tipagem molecular.....</b>	<b>24</b>
<b>1.9. Gene <i>invA</i>, <i>fliC</i> e <i>sefA</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
ARTIGO: PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i> E IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM.....	38
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS.....	44
<b>3. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>4. ANEXOS.....</b>	<b>49</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. O gênero *Salmonella* spp.

#### 1.1.1. Características

Microorganismos do gênero *Salmonella* são enterobactérias que infectam o trato gastrointestinal de todos os tipos de animais domésticos utilizados na cadeia alimentar humana, sendo estes patógenos um dos agentes mais prevalentes a ocasionar doenças de origem alimentar (CARY *et al.*, 2000; WAAGE *et al.*, 1999). O número exato de sorotipos é divergente entre os estudiosos do assunto, tendo sido adotado no presente trabalho os dados publicados pelo WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm) do Instituto Pasteur, na França, que, a cada cinco anos, publica uma nova versão do Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars (GRIMONT e WEILL, 2007).

O gênero *Salmonella* compreende 2579 sorotipos (GRIMONT e WEILL, 2007) de bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos e, em sua maioria, móveis (flagelados), com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são altamente adaptados ao hospedeiro (SHIVAPRASAD, 1999; CARY *et al.*, 2000; MILIOTIS *et al.*, 2003 ). Fermentam a glicose, mas não a lactose ou sucrose e são oxidase negativa. *Salmonella* é capaz de utilizar citrato como única fonte de carbono, enquanto outros gêneros exigem uma fonte mais complexa deste nutriente. Todas as salmonelas, com a exceção da *Salmonella* Typhi , produzem gás durante o processo de fermentação. Elas crescem à temperaturas entre 8 e 45°C em pH entre 4 e 9 e requer atividade hídrica ( $a_w$ ) acima de 0,94. Salmonelas são sensíveis ao calor temperaturas de 70°C ou acima provocam a sua morte. Elas também são suscetíveis a pasteurização do leite a 72,1°C por 15 segundos. É importante ressaltar que o tempo de cozimento precisa ser suficiente

para que seja atingida a temperatura adequada, para matar a bactéria, por toda a extensão do alimento.

Salmonelas são resistentes a dessecação e podem sobreviver por anos na poeira ou sujeira (MILIOTIS *et al.*, 2003) e por vários meses em água (MURRAY, 1991). A capacidade das salmonelas de sobreviverem fora dos hospedeiros, por períodos relativamente longos, proporciona outro dado importante ao se considerar a cadeia epidemiológica das salmoneloses (MARTINS *et al.*, 1988).

### 1.1.2. Classificação e nomenclatura

A classificação de *Salmonella* é baseada em sorologia e testes de susceptibilidade a bacteriófagos (RUBIN e WEINSTEIN, 1977). O gênero *Salmonella* vinha sendo classicamente dividido em três espécies: *S. typhi*, *S. choleraesuis* e *S. enterica*. Estas espécies são, atualmente, catalogadas por sua antigenicidade, como o descrito pelo esquema de Kauffmann-White (POPOFF e LE MINOR, 1992).

Fórmulas antigênicas representam particularmente sorotipos (sorovares). Contudo, designações como *S. typhimurium* são ainda aceitas (MILIOTIS *et al.*, 2003). A maioria dos sorotipos também tem nomes que freqüentemente são escritos, por conveniência, como se eles fossem (mas eles não são) nomes de espécies, por exemplo, *Salmonella typhimurium*. A convenção presente (GRIMONT e WEILL, 2007) é capitalizar a designação do sorotipo, indicá-lo (sem itálico) depois do nome do gênero, da espécie ou da subespécie. Como um exemplo *Salmonella typhimurium* seria escrita *Salmonella* sp. ser. Typhimurium, ou *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, ou ainda o bastante extenso e inconveniente *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (Tabela 1).

De acordo com LE MINOR e POPOFF (1987); REEVES *et al.* (1989) e BOYD *et al.* (1996), o gênero *Salmonella* possui duas linhagens que divergiram cedo em suas evoluções: a espécie *S. enterica* e *S. bongori*. No ano de 2004 uma nova espécie foi sugerida: *S.*

*subterranea* que foi reconhecida em 2005 pela Comissão Judicial do Comitê Internacional em Sistemática de Procariotos (SHELOBOLINA *et al.*, 2004). No entanto, para GRIMONT e WEILL (2007), essa nova espécie não integra o gênero *Salmonella*.

O esquema de identificação de Kauffmann e White classifica as salmonelas em sorotipos, tendo como base a composição dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, designado por número arábico e identificam os sorogrupos de *Salmonella* (A a Z), o capsular (Vi) encontrado em três sorotipos (Typhi, Paratyphi C e Dublin) e o antígeno flagelar (H) constituído de proteína (flagelina). O antígeno H ocorre em duas Fases (I e II), identificados por letras minúsculas (Fase I) e por números arábicos (Fase II). A síntese dos diferentes antígenos H, Fase I e Fase II, são codificadas pelos genes H1 e H2, respectivamente, e o gene H2 pode ou não estar funcionando e, quando isso ocorre, ele forma o flagelo de Fase II bem como uma proteína repressora do gene H1. A maioria das salmonelas apresenta as duas Fases (bifásicas), outras uma só Fase (monofásica), e existem aquelas que perderam o flagelo (imóveis) (CAMPOS, 2004).

Membros da espécie *S. enterica* são divididos em seis grupos de subespécies (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI). O grupo I inclui sorotipos que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente, como as *S. enterica* sv. Typhi, Paratyphi, Sendai, Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, Dublin, Gallinarum/Pullorum e Abortusovis. Os grupos de II a VI incluem *S. enterica* frequentemente isoladas de vertebrados de sangue frio (BÄUMLER *et al.*, 1998; HERRERA-LEON *et al.*, 2007). O grupo V inclui *S. bongori* (BOYD *et al.*, 1996). Na Tabela 1 verifica-se a correspondência entre os grupos e as espécies/subespécies e a divisão dos sorotipos dentro dessas espécies/subespécies.

**Tabela 1** – Nomenclatura atual de *Salmonella*.

Posição taxonômica (formato de escrita) e nomenclatura				
Gênero (capitalizado e com itálico)	Espécie (com itálico)	Subespécie (com itálico)	Sorotipos (ou sorovares) (capitalizado, sem itálico)*	Número de sorotipos em cada espécie ou subespécie <sup>(1)</sup>
	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (ou subespécie I)	Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium	1531
		<i>salamae</i> (ou subespécie II)	9,46:z:z39	505
		<i>arizonae</i> (ou subespécie IIIa)	43:z29:-	99
		<i>diarizonae</i> (ou subespécie IIIb)	6,7:l,v:1,5,7	336
		<i>houtenae</i> (ou subespécie IV)	21:m,t:-	73
<i>Salmonella</i>		<i>indica</i> (ou subespécie VI)	59:z36:-	13
	<i>bongori</i>	subespécie V	13,22:z39:-	22
<b>TOTAL (Gênero <i>Salmonella</i>)</b>				<b>2579</b>
<i>Salmonella</i>	<i>subterranea</i> <sup>(2)</sup>			<b>1</b>

\* Alguns sorotipos (sorovares) são listados como exemplo.

(1) - (GRIMONT e WEILL, 2007).

(2) - (SHELOBOLINA *et al.*, 2004).

Adaptado de: (SU e CHIU, 2007).

A habilidade dos isolados de *Salmonella* em transferir, adquirir e recombinar os genes da flagelina (*fliC*) para a Fase I e para o antígeno O (grupo de genes *rfb*) explica a existência de um número tão grande de sorotipos, mas isso também representa um maior limite para o esquema sorológico. De fato, estudos filogenéticos e, em particular, análise de enzimas multi-locus, demonstram que cepas dentro do mesmo sorotipo podem ser relacionadas de maneira distante (BELTRAN *et al.*, 1988; BOYD *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1994 e SELANDER *et al.*, 1990b)

## 1.2. Epidemiologia de *Salmonella* spp.

Salmonelose tem se tornado um problema crescente em todo o mundo durante as últimas décadas. *Salmonella* está entre as causas mais comuns de doenças infecciosas causadas por alimentos no mundo (D'AOUST, 1989; BAIRD-PARKER, 1990; MALORNY *et al.*, 2003a). Ainda que global, sua incidência é difícil de ser estimada; autores geralmente concordam em estimar que a porcentagem da população sofrendo por doenças transmitidas por alimentos contaminados a cada ano poderia ser maior que 30% em países industrializados e os números poderiam ser piores em países em desenvolvimento (MEAD *et al.*, 1999; WHO, 2007).

Uma variedade de produtos alimentares de origem animal como carne bovina, carne de frango, ovos e leite têm demonstrado carregar esses patógenos (GILLESPIE *et al.*, 2003; HALD *et al.*, 2006). Contudo, produtos do frango têm sido reconhecidos como as fontes mais importantes de infecção humana (CORY *et al.*, 2002). Apesar de *Salmonella* ser geralmente inativada com o cozimento, o manuseio e a preparação impróprios de carnes e produtos de origem animal continuam contribuindo para os casos de salmonelose (LI *et al.*, 2007). Também têm sido verificada a ocorrência de surtos de salmonelose veiculados por água (D'AOUST, 1989; BAIRD-PARKER, 1990).

No Brasil, a salmonelose é um problema muito sério especialmente devido a qualidade precária do saneamento básico em regiões mais pobres e falta de noções sobre higiene pessoal e com o manuseio de alimentos.

As consequências dessa infecção dependerão do sorotipo e do tipo de hospedeiro (BÄUMLER *et al.*, 1998). Certos sorotipos de *S. enterica* são restritos a um determinado tipo de hospedeiro. *S. Typhi*, *S. Paratyphi a*, *b*, *c* e *S. Sendai* causam doenças apenas em humanos; *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, em aves domésticas; *S. Dublin* em gado; *S. Choleraesuis*, em porcos; *S. Abortusovis*, em ovelhas e *S. Abortusequi* em cavalos (EKPERIGIN e NAGARAJA, 1998; BÄUMLER *et al.*, 1998).

Nos Estados Unidos, no ano de 2010, foram notificados aos Centros de Prevenção e Controle de Doenças 9 surtos de salmonelose envolvendo diferentes sorotipos de *Salmonella*. Dentre eles, *Salmonella* Typhimurium foi identificada em água de aquários de peixes e sapos. *Salmonella* Enteritidis, detectada em cascas de ovos, foi a que causou o surto com maior número de infectados, totalizando aproximadamente 2000, e que se espalhou por todo o país (CDC, 2011).

No Brasil, de 1999 a 2010 (atualizado até outubro), foram notificados à SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde) 6.971 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 1.804.932 pessoas expostas, 133.954 e registro de 88 óbitos. Em relação à distribuição dos surtos conforme a região, 48,7% foram notificados na região Sul, 32,3% na região Sudeste, 10,2% no Nordeste, 6,6% no Centro-Oeste e 2,1% na Região Norte. Do total de surtos, 46,6% tiveram agente etiológico definido pelo critério laboratorial ou clínico-epidemiológico. Dentre estes, a bactéria do gênero *Salmonella* sp. foi relacionada a 45,9% dos surtos (BRASILa, 2011).

No Estado do Paraná, no período entre janeiro de 1999 a dezembro de 2008, foram notificados 286 surtos de salmonelose nos quais 5.641 pessoas foram infectadas, 2.017 (35,9%) apresentaram os sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. Foram isoladas 310 cepas das quais 123 foram isoladas de pacientes e 187 de alimentos. Das 123 cepas provenientes de pacientes, 108 (87,8%) foram identificadas como *S. Enteritidis*. Da mesma forma, das 187 cepas de alimentos, 150 (80,6%) eram *S. Enteritidis* (KOTTWITZ *et al.*, 2010).

CÂMARA (2002), analisou os resultados laboratoriais e as Fichas de Investigação Epidemiológica que acompanharam amostras de alimentos envolvidos nos surtos, examinados pelo Laboratório Central de Saúde Pública Estadual (LACEN) de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 a 2001. Nesse período notificou-se 63 surtos dos quais 39 (62%) foram confirmados laboratorialmente e 24 (38%) não o foram. Analisou-se 156 amostras de alimentos, sendo que 64 (41%) foram positivas e 92 (59%) negativas. *Salmonella* sp. esteve presente em 14



surtos (35,9%), totalizando 16 cepas das quais 13 foram identificadas como *S. Enteritidis* (81,4%).

### 1.3. *Salmonella* isolada de amostras ambientais

O ambiente natural da *Salmonella* é o trato gastrointestinal, contudo, o indivíduo infectado com *Salmonella* elimina o organismo em suas fezes que atingem o esgoto doméstico que pode, por sua vez, contaminar fontes de água potável como as águas de rios, assim como sedimentos costais e estuarinos. Ambientes aquáticos são reservatórios de *Salmonella*, facilitando sua transmissão entre os hospedeiros (CHERRY *et al.*, 1972). Apesar da concentração de *Salmonella* em água ser baixa, a ingestão de água ainda pode causar infecção, porque a água pode passar rapidamente do estômago para o intestino sem estimular a digestão e, desta forma, escapar dos mecanismos de defesa naturais do hospedeiro (MURRAY, 1991).

Os animais são infectados por *Salmonella* principalmente através da alimentação, da água ou de fontes ambientais (D'AOUST, 1989). Para determinar a presença de *Salmonella* em fontes de água ambiental e potável métodos sensíveis e específicos são necessários. Há muitos problemas relacionados a detecção de *Salmonella* em água, como seu baixo número e presença irregular (WAAGE *et al.*, 1999). Além disso esse patógeno pode estar perdido entre uma microflora nativa de fundo (SOCKETT, 1991).

Alimentos e água ainda possuem os papéis principais na transmissão de *Samonella*. Contudo, esgoto e efluentes em geral têm sua importância particular (ESPIGARES *et al.*, 2006). O aumento da produção de esgotos tem ocasionado uma preocupação crescente com seu adequado tratamento, a fim de minimizar os impactos causados nos corpos hídricos, devido ao fato de esgotos apresentarem um grande número de microorganismos, dentre eles *Salmonella*. Ao atingir os corpos hídricos, a *Salmonella* pode contaminar outros animais e culturas

de alimentos circunvizinhas, como plantações e tanques de piscicultura que vem se mostrando, em todo o mundo, como uma alternativa atraente e economicamente sustentável na produção de alimentos de alto valor nutritivo (GERMANO e GERMANO, 2001).

#### **1.4. *Salmonella* isolada de amostras de frango**

Alimentos provenientes do frango são as maiores fontes de alimentos contaminados por *Salmonella* para humanos (TURNER *et al.*, 1998; WHYTE *et al.*, 2002; MAINALI *et al.*, 2011). Com o aumento mundial do consumo da carne de frango, devido ao seu elevado teor protéico e valor mais acessível (BOTTEZINI *et al.*, 2005), tem crescido a preocupação com o controle da contaminação por *Salmonella* das aves desde as granjas. Uma importante rota de introdução de *Salmonella* nas granjas é através de aves selvagens que vivem no entorno. *Salmonella* spp., especialmente *S. Typhimurium*, são comumente encontradas nos intestinos de pássaros selvagens que podem infectar a ração e a água dos frangos em granjas, assim como também os animais de estimação do homem (TIZARD, 2004). Além das aves, outros vetores como roedores, insetos, pessoas e equipamentos devem ser considerados.

Verifica-se uma grande variação na taxa de contaminação de carcaças de frango tanto no Brasil quanto em outros países. Esta variação pode estar relacionada a inúmeros fatores que vão desde a procedência do lote, condições higiênico-sanitárias dos abatedouros, contaminação cruzada ocorrida nas áreas de depenagem, lavagem, resfriamento e embalagem. Após o processamento, durante a etapa de transporte e comercialização, as carcaças ainda estão sujeitas à contaminação adicional (FUZIHARA *et al.* 2000; CORRY *et al.* 2002).

Em trabalhos realizados no Irã, JAMSHIDI *et al.* (2007), coletaram 60 esfregaços da pele de pescoço de carcaças de frangos após a etapa de resfriamento. A presença de *Salmonella* foi avaliada através de método de cultura convencional e foram confirmadas utilizando soro

polivalente O e H. Após, foi avaliada a amplificação por PCR do gene *invA* como método para a detecção de *Salmonella*. Pela metodologia convencional, 11,66% das amostras foram positivadas, sendo todos os resultados confirmados posteriormente pela PCR. Da mesma forma, SALEHI *et al.*, (2005) analisou 192 amostras de carcaças de frango havendo detectado a presença de *Salmonella* em 15,6% das amostras, sendo todas as cepas confirmadas, quanto ao gênero, posteriormente por PCR.

No estado de São Paulo, SANTOS *et al.* (2000) analisaram 150 carcaças de frango congeladas sendo detectada a presença de *Salmonella* spp. em 32% das carcaças. BONI *et al.* (2011) realizaram a detecção de *Salmonella* em 257 amostras provenientes de várias etapas do processamento do frango em abatedouros localizados na região central de Mato Grosso do Sul. Os resultados demonstraram que 11,28% das amostras apresentaram resultados positivos para *Salmonella*, dos quais 1,95% eram provenientes do campo e 9,33% do abatedouro.

## **1.5. Legislação aviária**

Ocupando a terceira colocação na produção mundial e a primeira nas exportações de carne de frango (UBA, 2009), o Brasil passou de quinto maior consumidor mundial de frango, em 2009, para a terceira colocação em 2010, ficando atrás apenas dos Emirados Árabes Unidos e do Kuwait. Num período de 26 anos (1983 a 2009) o consumo de carne de frango pelos brasileiros cresceu 300%. Em 2011 o país deve registrar um consumo interno da ordem de 47,3 kg per capita (AVISITE, 2011).

Considerando as exigências sanitárias do mercado internacional e tendo em vista a tendência mundial do aumento do consumo de produtos de origem aviária, a qualidade desses produtos é de extrema

importância, sendo uma preocupação dos órgãos de saúde pública, das indústrias alimentícias e dos próprios consumidores (RALL, 2009).

No entanto, em 2001 a Resolução – RDC ANVISA nº 12, de 02/01/2001 excluiu a obrigatoriedade da pesquisa de *Salmonella* sp. em carnes *in natura* de aves devido às limitações tecnológicas que impossibilitam garantir a ausência desse patógeno no produto. Por esta razão, a Resolução – RDC ANVISA nº 13, de 02/01/2001 estabeleceu a obrigatoriedade para os produtores de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados de incluir na rotulagem destes produtos as instruções de uso, preparo e conservação de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, como recomendações, que auxiliem o consumidor no controle do risco associado ao consumo de alimentos nos quais o microrganismo *Salmonella* sp. possa estar presente (BRASIL, 2001c; BRASIL, 2001d).

Verificou-se, portanto, a necessidade de um programa, a nível nacional, destinado a determinação da prevalência e quantificação das espécies do gênero *Salmonella* sp. em carne de frango exposta ao consumo humano. Nesse sentido foi elaborado o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF, cuja 1ª fase se desenvolveu no período entre 2004 e 2006 tendo sido analisadas 2710 unidades amostrais de carcaças de frango congeladas colhidas no comércio. Isolou-se *Salmonella* spp de 4% das amostras. Ainda que seja um nível de positividade baixo, o risco à saúde pública é existente (BRASILb).

No ano de 2003 o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 70 que instituiu o “Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus”, cujo o objetivo foi o de realizar o constante monitoramento da contaminação por *Salmonella* em abatedouros de aves (BRASIL, 2003).

## 1.6. Sorotipos Enteritidis e Typhimurium

*Salmonella* Typhimurium e Enteritidis são os dois sorotipos mais comumente associados com doenças humanas e são, portanto, de grande importância para a saúde pública (HERIKSTAD *et al.*, 2002; CDC, 2004).

Os sorotipos Typhimurium e Enteritidis, que apresentam a maior incidência, causam doenças em humanos, gado, aves, ovelhas, porcos, cavalos e roedores selvagens (BÄUMLER *et al.*, 1998). Os surtos de salmonelose humana ocorridos no Brasil causados por *Salmonella* Enteritidis aumentaram acentuadamente a partir da segunda metade da década de 1990, tornando-se um importante problema econômico e de saúde pública. Um estudo realizado com isolados de *Salmonella* enviados ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo mostrou que, entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* de origem humana passou de 1,2% para 64,9% (TAVECHIO *et al.*, 1996).

*Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis era comumente conhecida como um patógeno frequente em roedores. A partir dos anos 1980 o sorotipo surgiu como um sério problema a atingir os suprimentos alimentares humanos, em parte devido ao fato de frangos infectados, mas assintomáticos, poderem transmitir a bactéria para os ovos (PARKER, 2002).

O frango pode ser infectado por muitos sorotipos diferentes de *Salmonella*. Destes, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* são específicos ao hospedeiro e representam maior preocupação para a indústria do frango, mas não tem impacto em saúde pública. Outros sorotipos de *Salmonella enterica* freqüentemente isolados em frangos, como Typhimurium e Enteritidis, podem infectar um amplo espectro de hospedeiros e freqüentemente atingir a cadeia alimentar humana, causando infecções alimentares (BETANCOR *et al.*, 2010). Assim como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* pode ser transmitida verticalmente através dos ovos e horizontalmente de ovos e carne contaminados para o homem (AABO *et al.*, 2002).

## 1.7. Métodos de tipificação fenotípicos

Os métodos de investigação epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos (DTAs) englobam a pesquisa microbiológica e a identificação por técnicas de Biologia Molecular. A pesquisa microbiológica envolve etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivos, testes bioquímicos e sorológicos (GUTHRIE, 1992; FDA, 1998; MANZANO *et al.*, 1998; VAN KESSEL *et al.*, 2003). A obtenção de um resultado negativo para algum microrganismo suspeito requer cerca de quatro dias e a confirmação dos resultados positivos, até quinze dias. A metodologia convencional de diagnóstico apresenta outras limitações, uma vez que requer um número de células viáveis suficiente para permitir o seu isolamento (CHAICUMPA *et al.*, 1995). Além disso, variações na morfologia no perfil bioquímico das colônias, nos diferentes meios descritos na literatura, são fatores que aumentam a margem de erro do diagnóstico microbiológico (CAMPOS, 2005; FACH *et al.*, 1999).

Os primeiros métodos de tipagem para propósitos epidemiológicos avaliavam características fenotípicas, como a susceptibilidade a antimicrobianos, reações bioquímicas, susceptibilidade a bacteriófagos (fagotipagem) e proteínas da superfície (eletroforese de enzima multi-locus). Características fenotípicas não são estáveis como o material genético do microrganismo. Os resultados dos métodos fenotípicos tendem a agregar isolados em grandes grupos e podem variar dependendo das condições de teste, do número de vezes que o microrganismo é transportado e estresses ambientais. Além disso, esses métodos não discriminam entre cepas como os métodos baseados no DNA (THOMAS e WEBER (Ed), 2001).

O pré-enriquecimento da cultura é recomendado para a recuperação e identificação de microrganismos que podem ter sofrido injúria ou estresse em alguma etapa operacional do processo. Os meios para pré-enriquecimento mais comuns são lactose, água peptonada, verde brilhante, embora o meio lauril triptose, o meio açúcar manitol roxo

e o agar nutriente também são usados. Estes meios para pré-enriquecimento permitem o crescimento da maioria dos organismos presentes na amostra.

Após o passo do pré-enriquecimento, o enriquecimento seletivo é realizado para prover a oportunidade do pequeno número de *Salmonella* crescer, enquanto os organismos competidores são inibidos. Os meios recomendados para *Salmonella* incluem o tetracionato, o selenito cistina e o Rapport-Vassiliadis (FDA, 1998; HAMMACK, 1999).

O enriquecimento seletivo ainda permite o crescimento de culturas mistas. O plaqueamento para meios altamente seletivos permitirá o desenvolvimento de colônias discretas de *Salmonella*, inibindo o crescimento de culturas contendo outros organismos. Colônias com características de *Salmonella* são transferidas para outros meios para a confirmação da identificação. Na Tabela 2 constam os meios seletivos e diferenciais usados para *Salmonella*.

**Tabela 2** – Características típicas de crescimento de *Salmonella* em meios seletivos e diferenciais comumente utilizados.

Meio	Aparência da colônia
Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	Colônias incolores em um fundo rosa
Agar bismuto sulfito (BS)	Colônias pretas rodeadas por uma zona marrom a preta que emite um brilho metálico
Agar verde brilhante (BG)	Colônias rosa rodeadas por uma zona vermelha
Agar xilose lisina desoxicolato (XLD)	Colônias vermelhas com centro preto produtoras de H <sub>2</sub> S, colônias vermelhas não produtoras de H <sub>2</sub> S
Agar MacConkey (MA)	Colônias incolores e transparentes
Agar Hektoen entérico (HE)	Colônias azuis esverdeadas, a maioria com centro preto (produtoras de H <sub>2</sub> S)
Agar azul eosina metileno (EMB)	Colônias âmbar translúcidas a incolores

Fonte: (GUTHRIE, 1992)

Isolados suspeitos de ser salmonela são submetidos a testes bioquímicos, como os citados na Tabela 3, para confirmação (GUTHRIE, 1992; FDA, 1998). Uma vez que os isolados são confirmados como *Salmonella*, o teste sorológico pode ser executado. Preparados de anticorpos O, H e Vi de *Salmonella* estão disponíveis comercialmente. Geralmente o teste sorológico começa com o antisoro O. Os antisoros H e Vi são reservados para o uso em identificações específicas. Atualmente este método emprega mais de 150 antisoros O e H para a caracterização dos sorotipos de *Salmonella* (BOPP *et al.*, 2003; MIRZAIE *et al.*, 2010).

**Tabela 3 –** Reatividade bioquímica de *Salmonella*.

<b>Teste ou substrato</b>	<b>Reação positiva</b>	<b>Reação negativa</b>	<b>Reatividade<sup>a</sup> de <i>Salmonella</i></b>
Glicose	Base amarela	Base vermelha	+
Lisina descarboxilase	Base roxa	Base amarela	+
H <sub>2</sub> S	Enegrecimento	Sem enegrecimento	+
Urease	Cor roxo avermelhado	Sem mudança de cor	-
Meio Lisina descarboxilase	Cor roxa	Cor amarela	+
Meio fenol vermelho dulcitol	Cor amarela e/ou gás	Sem gás, sem mudança de cor	+ <sup>b</sup>
Meio KNC	Crescimento	Sem crescimento	-
Meio malonato	Cor azul	Sem mudança de cor	- <sup>c</sup>
Teste de indol	Superfície cor violeta	Superfície cor amarela	-
Meio fenol vermelho lactose	Cor amarela e/ou gás	Sem gás, sem mudança de cor	- <sup>c</sup>
Meio fenol vermelho sucrose	Cor amarela e/ou gás	Sem gás, sem mudança de cor	-
Teste de Voges-Proskauer	Cor rosa a vermelho	Sem mudança de cor	-



Teste vermelho	metil difusa	Cor vermelha	Cor amarela difusa	+
Citrato de Simmons	Crescimento, azul	cor	Sem crescimento, sem mudança de cor	v

a +, 90% ou mais positivo em 1 ou 2 dias; -, 90% ou mais negativo em 1 ou 2 dias; v, variável.

b - Maioria das culturas de *S. arizonae* são negativas.

c - Maioria das culturas de *S. arizonae* são positivas.

Fonte: (GUTHRIE, 1992; FDA, 1998).

Apesar de seu amplo emprego, a sorotipagem tem deficiências que limitam seu uso, incluindo que a técnica freqüentemente leva 3 ou mais dias para gerar um resultado e aproximadamente 5 a 8% dos isolados são parcialmente tipáveis ou não tipáveis (BOPP *et al.*, 2003; MIRZAI *et al.*, 2010).

Após o isolamento das cepas de *Salmonella*, a tipificação por bacteriófago pode ser procedida e é geralmente usada quando a origem e as características de um surto de infecção devem ser determinadas. Os sorotipos de *Salmonella* podem ser diferenciados baseados na reatividade com um definido grupo de bacteriófagos. Este teste é normalmente utilizado para propósitos epidemiológicos e são executados em laboratórios altamente especializados (MILIOTIS *et al.*, 2003).

Fagotipagem de *Salmonella* tem uma significância prática: construção de cepas através de transdução, fagotipagem para propósitos epidemiológicos de *Salmonella* (NICOLLE *et al.*, 1970; ANDERSON, 1974) e a aplicação dos fagos como agentes terapêuticos (FISCHETTI, 2001). Ultimamente os genes de fagos e seus produtos têm contribuído significativamente no desenvolvimento de vetores (cosmídeos, vetores de clonagem utilizados para transportar grandes segmentos de DNA tanto para dentro como para fora das células, vetores integrativos, promotores, etc.) e fonte de material biológico molecular (DNA e RNA polimerases, ligases, nucleases, recombinases, endonucleases de restrição, etc.).

Fagotipagem confere uma subtipagem detalhada dos isolados de *Salmonella* pertencentes a um sorotipo em particular. Caracterização mais aprofundada de isolados de *Salmonella* é de grande benefício porque habilita o pesquisador a relacionar os casos e surtos de salmoneloses com sua fonte e recomendar medidas para eliminar a fonte e prevenir a recorrência da doença. São conhecidos 2579 sorotipos de *Salmonella* (GRIMONT e WEILL, 2007). Contudo, as infecções em humanos e animais são primariamente causadas por um pequeno grupo de sorotipos que ocorrem comumente e quase todos pertencem a *S. enterica* subsp. *enterica*.

Geralmente essas técnicas tomam muito tempo, haja vista eles oferecerem resultados presuntivos depois de 3 a 4 dias e resultados definitivos após 5 a 6 dias (MANZANO *et al.*, 1998; MALORNY *et al.*, 2003b).

### **1.8. Detecção, identificação e tipagem molecular**

Pesquisadores tem usado uma variedade de métodos baseados no DNA para genotipar patógenos microbiais. Todos esses métodos usam campos elétricos para separar pedaços de DNA, incluindo cromossomos inteiros, plasmídeos, fragmentos de digestão por endonuclease de DNA cromossômico ou plasmidial e fragmentos de DNA amplificados. Os padrões únicos ou “impressões digitais” são visualizados por coloração do DNA com brometo de etídio ou por hibridização do DNA com provas marcadas (THOMAS e WEBER (Ed), 2001).

Nas últimas duas décadas, novos métodos de tipificação baseados em DNA, como a técnica do DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD - do inglês: Random Amplification of Polymorphic DNA), da ribotipagem, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – do inglês: Pulsed Field Gel Electrophoresis), eletroforese por enzima multi-locus (MLEE – do inglês: Multi-Locus

Enzyme Electrophoresis), análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP – do inglês: Restriction Fragment Length Polymorphism), têm contribuído para a reclassificação dos sorotipos de *Salmonella* em um novo esquema de grupos de subespécies (REEVES *et al.*, 1989; BÄUMLER *et al.*, 1997; BÄUMLER *et al.*, 1998).

Diferenciação de isolados de *Salmonella* e identificação da fonte de surtos podem ser realizadas utilizando-se técnicas de tipagem molecular, como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (CHEAH *et al.*, 2008). Os requisitos para uma PCR são uma DNA polimerase termoestável, uma pequena quantidade de DNA inicial (padrão) e dois primers de oligonucleotídeos adequados. Adicionar buffers e nucleotídeos à reação, colocar o tubo num termociclador e a reação começa (MÜLHARDT, 2007).

Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* podem facilmente serem isoladas e identificadas em laboratórios clínicos utilizando-se técnicas microbiológicas convencionais (BOPP *et al.*, 1999). No entanto, a confirmação do sorotipo deve ser realizada por um laboratório de referência, com estrutura mais especializada, sendo estes reduzidos a dois no Brasil (Instituto Adolfo Lutz e Instituto Oswaldo Cruz), ocasionando demora no atendimento das solicitações de confirmação de sorotipo. PCR e tecnologias baseadas em PCR provêm resultados rápidos e um alto nível de especificidade, constituindo uma ferramenta valiosa e uma alternativa em diagnósticos microbiológicos, quando padronizadas (JEYASEKARAN *et al.*, 2011). Métodos de PCR têm sido utilizados com sucesso para a rápida detecção de vários patógenos microbianos de produtos alimentares com especificidade e sensibilidade (RASMUSSEN *et al.* 1994; HILL 1996), bem como em amostras ambientais (WAAGE *et al.*, 1999; SOUMET *et al.*, 1999a), amostras isoladas de animais (MIRZAIE *et al.*, 2010), amostras clínicas humanas (ALVARES *et al.*, 2004). Portanto, a PCR é uma importante ferramenta para confirmar rapidamente o gênero *Salmonella* e os sorotipos de maior relevância em saúde pública.

A PCR monoplex envolve a amplificação de apenas um gene alvo por vez. Um dos avanços nos métodos de PCR é a PCR multiplex (mPCR) que consiste numa análise envolvendo a amplificação simultânea de mais de um gene alvo numa reação única (KAPLEY *et al.*, 2000). A detecção de *Salmonella* por meio de mPCR provê número de resultados positivos similar aquele obtido através de métodos bacteriológicos e tem reduzido o tempo de análise (SOUMET *et al.*, 1999a; JOFRE *et al.*, 2005). A amplificação simultânea de mais de uma região de DNA de interesse em uma reação reduz o trabalho, o tempo, o custo e o risco de contaminação cruzada.

ALVARES *et al.* (2004), na Espanha, padronizou uma mPCR para identificar os sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhimurium DT104 e U302, *Salmonella* do sorogrupo C2 e *Salmonella* sorotipo 4, 5, 12:i:-. Nos Estados Unidos, KIM *et al.* (2006) padronizou duas mPCR para identificar *S. Typhi* e *S. Typhimurium* de amostras clínicas. TRAFNY *et al.* (2006), na Polônia, desenvolveu uma mPCR para detectar *Salmonella* Enteritidis em fezes humanas. No Irã, JAMSHIDI *et al.* (2009) detectou *Salmonella* sp. e *S. Typhimurium*, por meio de mPCR, em 60 carcaças de frango tendo encontrado 8,3% e 1,6% de contaminação, respectivamente.

### 1.9. Gene *invA*, *fliC* e *sefA*

Um dos primeiros passos no ciclo patogênico da bactéria intracelular facultativa *Salmonella* spp. é a invasão das células do epitélio intestinal. O locus genético *inv*, localizado na ilha de patogenicidade SPI-1, permite *Salmonella* spp. adentrar células epiteliais cultivadas. O *invA* é um membro desse locus e é o primeiro gene de um operon consistindo de, pelo menos, dois genes de invasão adicionais (GALÁN *et al.*, 1992). O *invA* codifica a proteína no interior da membrana da bactéria responsável pela invasão às células epiteliais do hospedeiro (DARWIN e MILLER, 1999). A presença e a funcionalidade do gene *invA*

é constatada na maioria, senão em todas, as cepas de *Salmonella* virulentas (GALÁN *et al.*, 1991). O gene *invA* de *Salmonella* contém seqüências únicas para este gênero e tem provado ser um alvo adequado para PCR com potencial para aplicação diagnóstica (RHAN *et al.*, 1992). Este gene é reconhecido como padrão internacional para a detecção do gênero *Salmonella* (MALORNY *et al.*, 2003a). A amplificação do gene *invA* foi empregada por diversos autores para a detecção de *Salmonella* sp. (MALORNY *et al.*, 2003a; MALORNY *et al.*, 2003b ; JEYASEKARAN *et al.*, 2011) em carcaças de frango (OLIVEIRA *et al.*, 2002; JAMSHIDI, *et al.*, 2009).

Antígenos H são transmitidos pelo flagelo. Eles são compostos por subunidades de proteína chamadas flagelinas. Antígenos H são normalmente difásicos em *Salmonella*, sendo um dos aspectos específicos do gênero. A disponibilidade de dois sistemas genéticos, *fliC* e *fliB*, genes que estão localizados de forma afastada no cromossomo (SANDERSON *et al.*, 1987), expressando flagelinas diferentes, alternativamente (LINO, 1977; ZIEG *et al.*, 1977), poderia ajudar o organismo a sobreviver às defesas do hospedeiro, além de determinar as especificidades antigênicas do flagelo da Fase I e da Fase II, respectivamente. (MACNAB, 1987). A interação entre os genes *fliC* e *fliB* é considerada uma das causas que gera diversidade antigênica (OKAZAKI *et al.*, 1993) e um dos maiores mecanismos evolutivos entre os sorotipos de *Salmonella* (SELANDER *et al.*, 1990a,b). O gene *fliC* compreende três partes: uma parte 5' contendo 300 pares de nucleotídeos, uma parte 3' contendo 200 pares de nucleotídeos e uma parte mediana contendo 350 pares de nucleotídeos. As partes distais 5' e 3' tem sido largamente conservadas em suas seqüências através da diversidade de sorotipos (GRIMONT *et al.*, 2000).

A fímbria SEF14 compreende uma classe única de fímbria de *Salmonella* e foi primeiramente descrita em cepas de *S. Enteritidis* (THORNS *et al.*, 1990; MÜLLER *et al.*, 1991). O gene estrutural que codifica SEF14, *sefA*, tem sido clonado e seqüenciado e tem mostrado ser limitado na distribuição para os sorovares do grupo D.

Interessantemente, *S. Galinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhi* possuem o gene *sefA*, mas não expressa a fímbria SEF14 (TURCOTTE e WOODWARD, 1993). A especificidade única de SEF14 em *S. Enteritidis* tem sido aplicada com sucesso no desenvolvimento de testes específicos para detecção de *S. Enteritidis* em frango (MCLAREN *et al.*, 1992; HOORFAR e THORNS, 1996; THORNS *et al.*, 1996).

SOUMET e colaboradores, em trabalhos apresentados no ano de 1999, padronizaram mPCR para a detecção de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* de amostras ambientais de granjas. Num dos trabalhos, SOUMET *et al.* (1999a) utilizaram 3 pares de primers: ST11-ST15 (AABO *et al.*, 1993), que se mostrou específico para a detecção do gênero *Salmonella* e resultou numa amplificação de 429 pares de bases; S1-S4 (SOUMET *et al.*, 1997) selecionados a partir de um gene associado com a virulência e específicos para *S. Enteritidis*, cujo produto amplificado contém 250 pares de bases; e Fli15-Ty04 (SOUMET *et al.*, 1997) escolhidos do gene *fliC* e específicos para *S. Typhimurium*, apresentando amplificação de 620 pares de bases. No outro trabalho, SOUMET *et al.* (1999b) utilizou novamente os primers ST11-ST15; os primers Fli15-Tym, específicos para *S. Typhimurium*, resultando numa amplificação de 559 pares de bases; e os primers *sef167-sef478*, específicos para *S. Enteritidis*, produzindo amplificação em 312 pares de bases.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D.; OLSEN, J. E. **Salmonella** identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 7, 171–178. 1993.
- AABO, S.; CHRISTENSEN, J. P.; CHADFIELD, M. S.; CARSTENSEN, B.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. **Quantitative comparison of intestinal invasion of zoonotic serotypes of *Salmonella enterica* in poultry.** *Avian Pathol.* 31:41-47. 2002.
- 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.** *J. Clin. Microbiol.* 42:1734–1738. 2004.
- ANDERSON, E. S. **The phage typing of *Salmonella* other than *S. Typhi*, in *The World Problem of Salmonellosis*** (VAN OYE, E., ed), Dr.W.Junk Publishers, The Hague, pp. 89–109. 1974.
- AVISITE, O Portal da Avicultura na Internet. **Brasileiro já é o 3º maior consumidor mundial de carne de frango.** Disponível em: <http://www.avisite.com.br/noticias/default.asp?codnoticia=12082>. Acessado em: 12 Mai 2011.
- BÄUMLER, A.J.. **The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*.** *Trends Microbiol.* 5(8):318–322, 1997.
- BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A.; ADAMS, L.G. **Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*.** *Infect Immun* 66(10):4579–4587, 1998.
- BAIRD-PARKER, A. C. **Foodborne salmonellosis.** *Lancet* 336, 1231–1235. 1990.
- BELTRAN, P.; MUSSER, J. M.; HELMUTH, R.; FARMER III, J. J.; FRERICHS, W. M.; WACHSMUTH, I. K.; FERRIS, K.; MCWHORTER, A. C.; WELLS, J. G.; CRAVIOTO, A.; SELANDER, R. K. **Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7753–7757. 1988.
- BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul.** *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* v.12, n.1, p.84-95. 2011.
- BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STOCKBINE, N. A.. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*, p. 654–671. In P. R. Murray, E. J. BARON, J. H. JORGENSEN, M. A. PFALLER, and R. H. YOLKEN (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 8th ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C. 2003.

BETANCOR, L.; PEREIRA, M.; MARTINEZ, A.; GIOSSA, G.; FOOKES, M.; FLORES, K.; BARRIOS, P.; REPISO, V.; VIGNOLI, R.; CORDEIRO, N.; ALGORTA, G.; THOMSON, N.; MASKELL, D.; SCHELOTTO, F.; CHABALGOITY, J. A. **Prevalence of *Salmonella enterica* in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis.** *Journal of Clinical Microbiology*. p. 2413-2423, Vol. 48, No. 7. 2010.

BOTTEZINI, I. M. P., CORSO, M. P., VEIT, V. M. O uso de antibióticos na produção de frangos. Disponível em: <[http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia\\_arttec\\_carne.htm](http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia_arttec_carne.htm)>. Acesso em: 12 Jan. 2010.

BOYD, E. F.; WANG, F.-S.; BELTRAN, P.; PLOCK, S. A.; NELSON, K.; SELANDER, R. K. ***Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I.** *J. Gen. Microbiol.* 139:1125–1132. 1993.

BOYD, E. F.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. **Molecular genetic relationships of the salmonellae.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62:804–808. 1996.

BRASILa. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informações técnicas.** Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31758](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758). Acesso em: 12 Mai 2011.

BRASILb. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento e Pesquisa - PREBAF.** Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos?cat=Monitoramento+e+Pesquisa&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Category%2FMonitoramento+e+Pesquisa%2Fdfae6d804f6b8a57ae4fbfc894994279%2FPUBLISHED&econ=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Content%2FPREBAF%2F3c564580401a47ebb08eb654e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Alimentos&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/PREBAF](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos?cat=Monitoramento+e+Pesquisa&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FMonitoramento+e+Pesquisa%2Fdfae6d804f6b8a57ae4fbfc894994279%2FPUBLISHED&econ=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FPREBAF%2F3c564580401a47ebb08eb654e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Alimentos&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/PREBAF). Acesso em: 12 Mai 2011.

BRASILc. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC ANVISA nº 12, de 02/01/2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União de 10/01/2001, seção 1, p. 45. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012\\_02\\_01\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html). Acesso em 02 Jun 2011.

BRASILd. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC ANVISA nº 13, de 02/01/2001. **Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados.** Diário Oficial da União de 10/01/2001, seção 1, p. 54. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0013\\_02\\_01\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0013_02_01_2001.html). Acesso em 02 Jun 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. **Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp.**



**em Carcaças de Frango e Perus.** Diário Oficial da União de 10/10/2003, seção 1, p. 9. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>. Acesso em 17 Ago 2010.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, 1998 - 001.** 2002. 79 f. Monografia (especialização em gestão em saúde) - Escola de Saúde Pública "Dr. Jorge David Nasser", Campo Grande – MS. 2002.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. e Alterthum, F. (eds). São Paulo, Atheneu, p. 319-328. 2004.

CAMPOS, L. C. **Microbiologia**, 4 ed. Atheneu, São Paulo. 2005.

CARY, J. W.; LINZ, J. E.; BHATNAGAR, D. **Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis.** Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, USA. 2000.

CDC: **Salmonella Surveillance: Annual Summary.** Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, US. 2004

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella Outbreaks.** Disponível em <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>. Acesso em: 30 Mai 2011.

CHAICUMPA, W. *et al.* **Monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for the detection of Salmonella in foods.** *Asian Pacific Journal of Allergy e Immunology*. 13(2):159-166. 1995.

CHEAH, Y. K.; SALLEH, N. A.; LEE, L. H.; RADU, S.; SUKARDI, S.; SIM, J. **Comparison of PCR fingerprinting techniques for the discrimination of Salmonella enterica subsp. Enteric serovar Weltevreden isolated from indigenous vegetables in Malaysia.** *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:327–335. 2008.

CHERRY, W. B.; HANKS, J. B.; THOMASON, B. M.; MURLIN, A. M.; BIDDLE, J. W.; CROOM, J. M. **Salmonellae as an index of pollution of surface waters.** *Appl Microbiol.* 24: 334-40. 1972.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; BRESLINE, M. F.; DAVIES, R.H. **Source of salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and method of control.** *Applied Microbiology* 92: 424-432. 2002.

D'AOUST, J. Y. **Salmonella.** In: *Foodborne Bacterial Pathogens* ed. Doyle, M.P. pp. 327–445. New York: Marcel Dekker. 1989.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. **Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa.** *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 405-428. 1999.

EKPERIGIN, H. E.; NAGAJARA, K. U. **Salmonella.** *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 17-29. 1998.

ESPIGARES, E.; BUENO, A.; ESPIGARES, M.; GÁLVEZ, R. **Isolation of Salmonella serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk.** *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* v. 209, p. 103–107. 2006.

- FACH, P. *et al.*, **Evaluation of a polimerase chain reaction-based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples: Probelia *Salmonella* spp.** *Journal of Food Protection*. 62(12):1387-1393. 1999.
- FDA - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 1998.
- FISCHETTI, V. A. **Phage antibacterials make a comeback.** *Nat. Biotechnol.* 19, 734–735. 2001.
- FUZHARA, T. O., FERNANDES, S. A., FRANCO, B. D. **Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses.** *Journal of Food Protection.*, 63(12):1749-1753. 2000.
- GALÁN, J. E.; CURTISS III, R. **Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhimurium* are deficient for entry into mammalian cells.** *Infect. Immun.* 59:2901–2908. 1991.
- GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. **Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family.** *J Bacteriol.* 174(13):4338-49. 1992.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, p. 204-208. 2001.
- GILLESPIE, B.E., MATHEW, A.G., DRAUGHON, F.A., JAYARAO, B.M.; OLIVER, S.P. **Detection of *Salmonella enterica* somatic groups C1 and E1 by PCR-enzymelinked immunosorbent assay.** *Journal of Food Protection* 66 (12): 2367-2370. 2003.
- GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. pp. 1-19. In: WRAY, C.; WRAY, A. (eds) ***Salmonella* in Domestic Animal.** CAB International. 2000.
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. -X. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.** 9<sup>th</sup> edition.WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.2007.
- GUTHRIE, R. K. ***Salmonella*.** Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1992
- HALD, T.; WINGSTRAND, A.; BRØNDSTED, T.; WONG, D. M. A. L. F. **Human Health Impact of *Salmonella* Contamination in Imported Soybean Products: A Semiquantitative Risk Assessment.** *Foodborne Pathogens and Disease* v. 3, n. 4, 2006.
- HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R.M.; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; ANDREWS, W.H. **Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassilladis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbiol load.** *J Food Prot* 62(1):16–21, 1999.
- HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R. V. ***Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping.** *Epidemiol. Infect.* 129: 1-8. 2002.
- HERRERA-LEON, S.; RAMIRO, R.; ARROYO, M.; DIEZ, R.; USERA, M. A.; ECHEITA, M. A. **Blind comparison of traditional serotyping with three**

- multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res. Microbiol.* 158: 122-127. 2007.
- HILL, W.E. The polymerase chain reaction for the detection of food borne pathogen. *Critical Rev Food Sci Nutr.* 36:123–173. 1996.
- HOORFAR, J. e THORNS, C. J. Rapid identification and serotyping of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 4, 317–320. 1996.
- JAMSHIDI, A.; ZAHRAEI-SALEHI; AFSHARI-NIC, S. Detection of *Salmonella spp* contamination of carcasses slaughtered in poultry abattoir in Mashhad, Iran. *Archives of Razi Institute.* Vol. 62, No. 4, 229-233. 2007.
- JAMSHIDI, A.; BASSAMI, M. R.; AFSHARI-NIC, S. Identification of *Salmonella spp.* and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int. J. Vet. Res.* 3,1:43-48. 2009.
- JEYASEKARAN, G.; RAJ, K.; SHAKILA, R.; THANGARANI, A.; SUKUMAR, D.; JAILANI, V. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovars by multiplex PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 27, Number 4, pp. 953-959(7). 2011.
- JOFRE, A. B.; MARTIN, M.; GARRIGAA, M.; HUGAS, M.; RODRIGUEZ-LAZARP, P. D.; AYMERICH, T. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol.* 22:109–115. 2005.
- KAPLEY, A.; LAMPEL, K.; PUROHIT, H. J. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR. *Biotechnol. Lett.* 22:1913–1918. 2000.
- KIM, S.; FRYE, J. G.; HU J.; FEDORKA-CRAY, P. J.; GAUTOM, R.; BOYLE, D. S. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *Enteric*. *Journal of Clinical Microbiology.* p. 3608–3615. Vol. 44, No. 10, 2006.
- KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. DE; ALCO CER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences.* v. 32, n. 1, p. 9-15. 2010.
- LE MINOR, L. e POPOFF, M. Y. Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacterio.l* 37, 465–468. 1987.
- LI, J.; NELSON, K.; MCWHORTER, A. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2552–2556. 1994.
- LI, X.; PAYNE, J. B.; SANTOS, F. B.; LEVINE, J. F.; ANDERSON, K. E.; SHELDON, B. W. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis and pulsed field gel electrophoresis. *Poult. Sci.* 86: 591-597. 2007
- LINO, T. Genetics of structure and function of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 11:166-182. 1977.

- MCLAREN, I. M.; SOJKA, M. G.; THORNS, C. J.; WRAY, C. **An interlaboratory trial of a latex agglutination kit for rapid identification of *Salmonella enteritidis***. *Veterinary Record*. 131, 235–236. 1992.
- MACNAB, R. M. Flagella. pp. 70–83. 1987. In: NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBERGER, H. E. (eds.) ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology**. Vol. I. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- MAINALI, C.; MCFALL, M. E.; KING, R. K. **Validation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* in crops of broiler chickens**. *Poult Sci*. 90:660-664. 2011.
- MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. **Multicenter Validation of the Analytic Accuracy of *Salmonella* PCR: toward an international standard**. *Applied Environmental Microbiology*. 69 (1): 290-296. 2003a.
- MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBYOEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. **Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method**. *International Journal of Food Microbiology*. 89: 241-249. 2003b.
- MANZANO, M.; COCLIN, L.; ASTORI, G.; PIPAN, C.; BOTTA, G. A.; CANTONI, C.; COMI, G. **Development of a PCR microplate hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food**. *Molecular and Cellular Probes*. 12: 227-234. 1998.
- MARTINS, M. T.; PESSOA, G. V. A.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z.; MONTEIRO, C. K.; COIMBRÃO, C. A.; MARQUES, E.; IRINO, K. MARTINS, M.T. *et al.* **Isolamento de *Salmonella* em ambiente aquático: significado sanitário**. *Rev. Microbiol.* **19**:29-39, 1988.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; *et al.* **Food-related illness and death in the United States**. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5): 607–625. 1999.
- MILIOTIS, M.D.; BIER, J. W. **International handbook of foodborne pathogens**. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 2003.
- MIRZAI, S.; HASSANZADEH, M.; ASHRAFI, I. **Identification and characterization of *Salmonella* isolates from captured house sparrows**. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34(2): 181-186. 2010.
- MÜLHARDT, C. **Molecular Biology and Genomics**. Elsevier Inc. Munich, Germany. 2007.
- MÜLLER, K. -H.; COLLINSON, K. S.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. **Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis***. *Journal of Bacteriology*. 173, 4765–4772. 1991.
- MURRAY, C.J. **Salmonellae in the environment**. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties* **10**, 765– 785. 1991.
- NICOLLE, P.; VIEU, J. F.; DIVERNEAU, G. **Supplementary lysotyping of Vi-positive strains of *Salmonella typhi*, insensitive to all the adapted**

preparations of Craigie's Vi II phage (group I+IV). *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* 29,609–617. 1970.

OKAZAKI, N.; MATSUO, S.; SAITO, K.; TOMINAGA, A.; ENOMOTO, M. **Conversion of the *Salmonella* Phase 1 Flagellin Gene *fliC* to the Phase 2 Gene *fljB* on the *Escherichia coli* K-12 Chromosome.** *Journal of Bacteriology* p. 758-766. Vol. 175, No. 3. 1993.

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

PARKER, C. T.; HARMON, B.; GUARD-PETTER, J. **Mitigation of avian reproductive tract function by *Salmonella enteritidis* producing high-molecular-mass lipopolysaccharide.** *Environ. Microbiol.* 4:538–545. 2002.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars.** WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, 1992.

RALL, V. L. M.; MARTIN J. G .P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. **Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol.46, n.3, pp. 167-174. 2009.

RASMUSSEN, S.R.; RASMUSSEN, H.B.; LARSEN, L.R.; HOFF-JORGENSEN, R.; CANO, R. **Combined polymerase reaction hybridization microplate assay used to detect leukemia virus and *Salmonella*.** *Clin Chem.* 40:200–205. 1994.

REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER III, J.J. **Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb.** *J Clin Microbiol* 27(2):313–320, 1989.

RAHN, K.; DEGRANDIS, D. S.; CLARKE, R. C.; MCEWEN, S. A.; GALAN, J. E.; GINOCCHOIO, C.; CURTISS, R. III; GYLES, C. L. **Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*.** *Mol. Cell. Probes.* 6:271–279. 1992.

RUBIN, R. H. e WEINSTEIN, L. **Salmonellosis: Microbiologic, Pathogenic and Clinical Features.** New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation. 1977.

SALEHI, T. Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. **Detection of *InvA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method.** *International Journal of Poultry Science.* 4 (8): 557-559, 2005.

SANDERSON, K. E.; HURLEY, J. A. **Linkage map of *Salmonella typhimurium*.** pp. 70–83. In: NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBERGER, H. E. (Eds.) ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology.** Vol. I. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1987.

- SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. **Salmonella em carcaças de frango congeladas.** *Pesq. Vet. Bras.* vol.20, n.1, pp. 39-42. 2000.
- SELANDER, R. K.; BELTRAN, P.; SMITH, N. H.; BARKER, R. M.; CRICHTON, P. B.; OLD, D.; MUSSER, J. M.; WHITTAM, T. S. **Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella paratyphi* B.** *Infection and Immunity.* 58, 1891–1901. 1990a.
- SELANDER, R. K.; BELTRAN, P.; SMITH, N. H.; HELMUTH, R.; RUBIN, F. A.; KOPECKO, D. J.; FERRIS, K.; TALL, B. D.; CRAVIOTO, A.; MUSSER, J. M. **Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers.** *Infection and Immunity.* 58, 2262–2275. 1990b.
- SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. **Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov.** *Appl Environ Microbiol.* 70:2959-2965, 2004.
- SHIVAPRASAD, H. L. **Pullorum diseases and fowl typhoid.** In: CALNEY, B. W.; BARNES, H. J. BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R. and SAIF, Y. M. *Diseases of Poultry*, p. 82 – 96. 1999.
- SOCKETT, P. N. **The economic implications of human *Salmonella* infection.** *J Appl Bacteriol*; 71: 289-95. 1991.
- SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, V. *et al.*, 1997. **Simultaneous detection by PCR of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis from environmental samples of poultry houses.** In: *Salmonella and Salmonellosis Proceedings* ed. Colin, P., Le Goux, J.M. and Clement, G. pp. 53–57. Ploufragan, France: ISPAIA.
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. **Evaluation of a multiplex-PCR-based assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environment swabs of poultry houses.** *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 113-117. 1999a.
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. **Identification by a multiplex-PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environment swabs poultry houses.** *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 1-6. 1999b.
- SU, L.-H.; CHIU, C.-H. ***Salmonella* nomenclature.** *Chang Gung Med J.* Vol. 30, n. 3. 2007.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.; NEVES, B. C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. **Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 38:315-322. 1996.
- TIZARD, I. **Salmonellosis in wild birds.** *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 13: 0-66. 2004.
- THOMAS, J. C; WEBER, D. J. (Eds) **Epidemiologic methods for the study of infectious diseases.** *Oxford University Press.* 2001.

- THORNS, C. J.; SOJKA, M. G.; CHASEY, D. **Detection of a novel fimbrial structure on the surface of *Salmonella enteritidis* using a monoclonal antibody.** *Journal of Clinical Microbiology.* 28, 2409–2414. 1990.
- THORNS, C. J.; BELL, M. M.; SOJKA, M. G.; NICHOLAS, R. A. **Development and application of enzymelinked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen.** *Journal of Clinical Microbiology.* 34, 792–797. 1996.
- TRAFNY, E. A.; KOZTOWSKA, K. ; SZPAKOWSKA, M. **A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in human faeces.** *Letters in applied microbiology.* vol. 43, n° 6, pp. 673-679. 2006.
- TURCOTTE, C. e WOODWARD, M. J. **Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding SEF14, a fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*.** *Journal of General Microbiology.* 139, 1477–1485. 1993.
- TURNER, A. K., LOVELL, M. A., HULME, S. D., ZHANG-BARBER, L., BARROW, P. A. **Identification of *Salmonella typhimurium* Genes Required for Colonization of the Chicken Alimentary Tract and for Virulence in Newly Hatched Chicks.** *Infect Immun.* , 66(5):2099-106. 1998.
- UBA - UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2009.** Disponível em [http://www.uba.org.br/ubanews\\_files/rel\\_uba\\_2009.pdf](http://www.uba.org.br/ubanews_files/rel_uba_2009.pdf). Acessado em: 12 Mai 2011.
- VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; PERDUE, M. L. **Using a portable real-time PCR assay to detect *Salmonella* in raw milk.** *Journal of food protection* 66: 1762-1767. 2003.
- WAAGE, A.S.; VARDUND, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. **Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay.** *Journal of Applied Microbiology,* 87, 418–428, 1999.
- WHO. World Health Organization. **Food safety and foodborne illness.** Fact sheet no. 237. 2007.
- WHYTE, P.; MCGILL, K.; COLLINS, J.D.; GORMELY, E. **The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry.** *Vet. Microbiol.* 89:53–60. 2002.
- ZIEG, J.; SILVERMAN, M.; HILMEM, M.; SIMON, M. **Recombination switch for gene expression.** *Science.* 196:170-172. 1977.

Correspondência Fabíola  
Fatima das Chagas  
tibe.chagas@gmail.com

## Padronização de PCR multiplex para confirmação do gênero *Salmonella* e identificação dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium

Fabíola Fatima das Chagas,<sup>1</sup> Bruno do Amaral Crispim,<sup>2</sup>  
Kelly Mari de Oliveira Pires<sup>2</sup> e Alexeia Barufatti Grisolia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

A salmonelose é uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos e água contaminados devido ao número de pessoas afetadas anualmente e à conseqüente necessidade de gastos públicos para tratamentos médico-hospitalares e do reprocessamento e/ou destruição de alimentos contaminados. No presente trabalho isolaram-se cepas de *Salmonella* sp. de carcaças de frango e amostras de água de piscicultura através de métodos de cultura convencionais. Posteriormente, padronizou-se PCR multiplex, utilizando-se *primers* específicos dos genes *invA*, *fliC* e *sefA*, para a simultânea confirmação do gênero *Salmonella* e a detecção dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis das cepas isoladas. De 50 amostras de carcaças de frango, por meio de PCR multiplex, verificou-se índice de 90% de contaminação, sendo confirmadas 66 cepas de *Salmonella*, dentre as quais 28 (42,42%) foram detectadas como *Salmonella* Enteritidis, não havendo detecção de *Salmonella* Typhimurium. De 15 amostras de água de piscicultura, 73,33% foram confirmadas como *Salmonella* sp. e não foi detectada a presença dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis. A PCR multiplex padronizada mostrou-se bastante sensível e pode ser empregada como alternativa aos testes bioquímicos e sorológicos, permitindo a rápida e confiável confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

### INTRODUÇÃO

Salmonelose tem se tornado um problema crescente em países do mundo todo durante as últimas décadas. *Salmonella* está entre as causas mais comuns de doenças infecciosas causadas por alimentos no mundo (D'AOUST, 1989; BAIRD-PARKER, 1990; MALORNY *et al.*, 2003a). A doença gera anualmente um alto custo à saúde pública mundial. Nos EUA, no ano de 2009, o custo econômico da salmonelose foi de US\$2.649.413.401,00 (ERS/USDA, 2010). Conforme dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), de 1999 a 2010 foram notificados 6971 surtos de doenças transmitidas por alimentos sendo que em 45,9% dos casos

notificados, *Salmonella* sp. foi o agente etiológico envolvido.

*Salmonella* é capaz de infectar o trato gastrointestinal de todos os tipos de animais domésticos utilizados na cadeia alimentar humana. Uma variedade de produtos alimentares de origem animal como carne bovina, carne de frango, ovos e leite têm demonstrado carregar esses patógenos (GILLESPIE *et al.*, 2003; HALD, *et al.*, 2006). Contudo, produtos do frango têm sido reconhecidos como as fontes mais importantes de infecção humana (TURNER *et al.*, 1998; CORRY *et al.*, 2002; WHYTE *et al.*, 2002; MAINALI *et al.*, 2011). Com o aumento mundial do consumo da carne de frango, devido



ao seu elevado teor protéico e valor mais acessível (BOTTEZINI *et al.*, 2005), tem crescido a preocupação com o controle da contaminação por *Salmonella* das aves desde as granjas.

Surtos veiculados por água também têm ocorrido (D'AOUST, 1989; BAIRD-PARKER, 1990). A capacidade das salmonelas de sobreviverem fora dos hospedeiros, por períodos relativamente longos, proporciona outro dado importante ao se considerar a cadeia epidemiológica das salmoneloses (CORREA & CORREA, 1979; MARTINS *et al.*, 1988; MILIOTIS *et al.*, 2003). Estando livres no meio ambiente, elas podem contaminar lagos, rios, tanques de piscicultura, zonas costeiras, entre outros.

O gênero *Salmonella* compreende 2579 sorotipos (GRIMONT & WEILL, 2007) de bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos e, em sua maioria, móveis (CARY *et al.*, 2000; MILIOTIS *et al.*, 2003). Os sorotipos mais isolados em humanos (SOUJET *et al.*, 1999) e em surtos de doenças transmitidas por alimentos (HERIKSTAD *et al.*, 2002) são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, sendo que *S. Enteritidis* apresentou um aumento expressivo de isolamentos reportados em todo o mundo a partir da década de 1980. Em trabalhos mais recentes, a mesma tendência é observada, sendo *S. Enteritidis* o sorotipo mais prevalente (RODRIGUE *et al.*, 1990; FANTASIA *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1996; AMINI *et al.*, 2010; HASSANEIN *et al.*, 2011). No Brasil, a partir dos anos 1990 os relatos de isolamento de *S. Enteritidis* apresentaram aumento significativo (FERREIRA *et al.*, 1990; KAKU *et al.*, 1995; PERESI *et al.*, 1998; REZENDE *et al.*, 2005). No ano de 1996, TAVECHIO *et al.* em estudo realizado com isolados de *Salmonella* enviados ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo mostrou que, entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* de origem humana aumentou de 1,2% para 64,9%.

Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* podem facilmente serem isoladas e identificadas em laboratórios clínicos utilizando-se técnicas microbiológicas convencionais (BOPP *et al.*, 1999). No entanto, as metodologias para isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos e água contaminados são trabalhosas, requerendo de 5 a 7 dias (FLÓRES *et al.*, 2001)

para a obtenção de resultado negativo, não são compatíveis com rotinas de análise de uma grande quantidade de amostras (MAINALI *et al.*, 2011). As provas bioquímicas para confirmação do gênero nem sempre apresentam resultados confiáveis. Por fim, a confirmação do sorotipo deve ser realizada por um laboratório de referência, sendo que no Brasil só existem os Institutos Adolfo Lutz e Oswaldo Cruz. Por estas razões, a padronização de metodologias rápidas de diagnóstico e de custo acessível tem sido desenvolvida (ALVARES *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; JAMSHIDI *et al.*, 2009; DE FREITAS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica simples, de custo relativamente reduzido, sensível (RAMPERSAD *et al.*, 2008), confiável e que proporciona agilidade nos resultados (SALEHI *et al.*, 2005) sendo bastante empregada na identificação e confirmação de *Salmonella* sp., bem como dos sorotipos de maior relevância em saúde pública.

Tendo em vista a dificuldade na confirmação do gênero e dos sorotipos de interesse em saúde pública e considerando que grande parte da carne de frango produzida é comercializada na forma de carcaças inteiras congeladas e que na região da Grande Dourados-MS, Brasil a piscicultura vem recebendo grandes incentivos para seu desenvolvimento, os objetivos do presente trabalho foram o isolamento de cepas de *Salmonella* spp. de carcaças de frango congeladas e amostras de água de piscicultura, através de metodologia de cultura convencional, preconizada pela APHA (2001), e posterior confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos *Enteritidis* e *Typhimurium* por meio de PCR multiplex.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**Obtenção de amostras.** Entre os meses de março de 2010 a março de 2011, 50 amostras de carcaças de frango, provenientes de abatedouros localizados em Mato Grosso do Sul e comercializados em supermercados de Dourados-MS, Brasil, foram coletadas aleatoriamente e transportadas até o laboratório sob refrigeração, na mesma embalagem de comercialização. Para as análises de água foram coletadas 15 amostras de água provenientes de pisciculturas localizadas no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de maio a junho de 2010. As amostras de água foram armazenadas em frascos de vidro estéreis, transportadas até o laboratório sob refrigeração e analisadas em seguida.

**Análises microbiológicas.** Conforme metodologia preconizada pela APHA (2001), homogeneizou-se 25 g de diferentes regiões da carcaça do frango em 225 mL de água peptonada tamponada estéril (Oxoid). As amostras ambientais foram processadas homogeneizando-se 10 mL da amostra de água de piscicultura em 90 mL de água peptonada tamponada estéril (Oxoid). As etapas seguintes foram empregadas tanto para as amostras de carcaça de frango quanto para as amostras de água de piscicultura. Após 24h em estufa à 37°C, transferiu-se 1mL do pré-enriquecimento para 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC - Acumedia) e 0,1mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV - Isofar) que foram acondicionados em estufa a 37°C por 24h e a 42°C por 48h, respectivamente. A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, as amostras foram semeadas em agar Hektoen entérico (Merck) e incubadas a 37° C por 24h. Colônias com características de *Salmonella* sp., enegrecidas e com halo incolor, foram semeadas em agar TSI – tríplice açúcar e ferro (Merck) e agar MIL – Motilidade, Indol e Lisina. As amostras, cujo teste bioquímico resultou positivo, foram armazenadas em agar nutriente (AN - Merck) para posterior determinação do gênero e identificação dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium por meio de PCR multiplex.

**Extração de DNA genômico.** As cepas isoladas de carcaças de frango e das águas de pisciculturas armazenadas em agar nutriente foram reativadas em água peptonada tamponada a 37°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução salina estéril (85%) na proporção de 9:1, sendo 9 mL de solução salina e 1 mL de água peptonada tamponada contendo bactérias. As amostras diluídas em solução salina foram submetidas à extração de DNA utilizando clorofórmio, adaptado a partir de WILSON *et al.* (1992). Foram alíquotados 300 µL de cada amostra em microtubo de polipropileno de 2 mL e acrescentados 2,5 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 500 µL de LSS (Lauril Sulfato de Sódio) a 20%, homogeneizados em *vortex* e incubados a 60°C em banho-maria por 2 horas. Após a incubação, adicionou-se 800 µL de clorofórmio e agitaram-se os microtubos

vigorosamente em *vortex* até completa homogeneização. Em seguida, foram acrescentados 350 µL de solução de precipitação protéica (acetato de potássio; ácido acético glacial; H<sub>2</sub>O), homogeneizados novamente em *vortex*. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 14.000 RPM por 10 min. para que a fase aquosa pudesse ser retirada e transferida para outro microtubo. Foi adicionado 1 mL de etanol 100% gelado e, logo em seguida, homogeneizado por inversão até a formação de precipitado (entre 30 e 60 s). Posteriormente, o material foi centrifugado a 13.000 RPM por 5 min. e, após centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 mL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 2 min. e desprezou-se o sobrenadante. Após esta etapa o microtubo foi invertido para a secagem do sedimento (10 a 15 min.), adicionaram-se 100 µL de TE (Tris-EDTA) pH 8,7 com RNase (Fermentas), homogeneizou-se lentamente (1 µL de RNase para cada 1000 µL de TE). O DNA ressuspenso em TE foi incubado a 37°C por 1 hora e posteriormente armazenado em freezer a -20 °C.

**Análise da quantidade e qualidade do DNA.** A quantidade e a pureza do DNA extraído de cada amostra foram obtidas por meio de espectrofotometria, utilizando espectrofotômetro (Nanodrop ND-200). Além disso, 10 µL do DNA extraído, acrescido de 2 µL tampão Blue Orange Loading Dye (Fermentas) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. O DNA foi visualizado no gel e fotografado em fotodocumentador (UVP) sob luz UV.

**PCR primers.** As amostras de DNA foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex adaptada de SANTOS *et al.* (2001). Foram utilizados 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores: uma seqüência de oligonucleotídeos específica para a detecção do gênero *Salmonella*, selecionada a partir do gene *invA*. Fli15-Typ04, selecionado a partir do gene *fliC* e específico para *Salmonella* Typhimurium. S1-S4, selecionado do gene *sefA* associado com virulência e específico para *Salmonella* Enteritidis (Tabela 1).

**Tabela 1.** Primers utilizados para a identificação por PCR de *Salmonella* sp. (1), *Salmonella* Typhimurium (2) e *Salmonella* Enteritidis (3).

Gene alvo	Seqüência do primer 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>invA</i> (1)	F – GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG	284	RAHN <i>et al.</i> , 1992
	R – TCATCGCACCGTCAAAGG		
<i>fliC</i> (2)	F – CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	620	SOMET <i>et al.</i> , 1997
	R - ACTGGTAAAGATGGCT		
<i>sefA</i> (3)	F – GCCGTACACGAGCTTATAGA	250	SOMET <i>et al.</i> , 1997
	R - ACCTACAGGGGCACAATAAC		

### PCR multiplex para a detecção do gênero *Salmonella* e identificação dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex adaptada de SANTOS *et al.* (2001). Foi preparada uma reação de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix (Fermentas), 1,5  $\mu\text{L}$  (10  $\text{pM}/\mu\text{L}$ ) de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (IDT) e 50 a 100ng de DNA genômico. As reações em cadeia pela polimerase foram realizadas em termociclador (Biorad) e consistiu em pré-aquecimento de 94°C por cinco min. antes da inicialização dos 35 ciclos, cada qual conduzido a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s para o anelamento dos *primers* e extensão, a 72°C por 30 s, catalisada pela atividade da DNA polimerase, e uma extensão final por sete min. a 72°C. Todas as reações foram conduzidas utilizando-se uma amostra controle negativo, onde o DNA foi substituído por igual volume de água ultra pura. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, a uma voltagem de 120 V, por 40 min. O gel foi preparado com tampão TBE (1x) e corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi de 50 bp DNA Ladder (Promega), sendo o mesmo misturado ao tampão de corrida (*Loading Buffer*) (Fermentas) e água ultra pura. As bandas de DNA dos produtos amplificados foram visualizadas no gel e fotografado em fotodocumentador (UVP) sob luz UV.

**Limiar de detecção de *Salmonella* sp. da PCR.** A partir de uma amostra de DNA, com a quantidade de 21  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , foi realizada diluição seriada em água ultra pura e em TE, em escala 1:10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup>. Dois  $\mu\text{L}$  de cada amostra diluída foi adicionado aos reagentes da PCR e o protocolo da PCR para detecção de *Salmonella* sp., conforme já descrito, foi realizado para determinar a quantidade mínima de DNA para a detecção.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA adaptada foi executada utilizando-se clorofórmio. O DNA genômico extraído apresentou rendimento médio de 5,39  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para as amostras de *Salmonella* spp. testadas. A razão 260/280 resultou média de 1,84. O limite de detecção da PCR utilizando pares de oligonucleotídeos visando a amplificação do gene *invA* de *Salmonella* é demonstrado na Figura 1. Quando o DNA genômico de *Salmonella* sp. foi testado utilizando-se água ultra pura para as diluições, a banda específica de 284 pb pode ser observada até a concentração de 420  $\text{fg}/\mu\text{L}$ . Quando utilizou-se TE na diluição do DNA, verificou-se banda até a concentração de 4,2 pg. RAHN *et al.* (1992) observaram limite de detecção de 27  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , STONE *et al.* (1994) observaram 30  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , SANTOS *et al.* (2001) obtiveram 63  $\text{fg}/\mu\text{L}$  e UPADHYAY *et al.* (2010) obtiveram 10  $\text{pg}/\mu\text{L}$ . Verifica-se alta

sensibilidade na técnica padronizada neste trabalho, o que permite a detecção do patógeno mesmo em amostras contendo pouco DNA.

Das 50 carcaças de frango analisadas, 96% foram positivas pela metodologia convencional, tendo sido isoladas 69 cepas com perfil bioquímico de *Salmonella* spp., provenientes tanto do caldo Selenito Cistina quanto do caldo Rappaport Vassiliadis Das 69 cepas, 66 foram identificadas, por meio da tecnologia de PCR multiplex, pertencentes ao gênero *Salmonella*. A amplificação do produto da PCR foi visualizada em gel de agarose e verificou-se a formação do fragmento de 284 pares de bases (gene *invA*) nas amostras positivas para o gênero *Salmonella* (Figura 1) Assim sendo, foi possível evidenciar a contaminação de 90% das carcaças de frango analisadas. Essa porcentagem de contaminação foi semelhante à encontrada por ALMEIDA *et al.* (2000), no estado de Mato Grosso, que verificou 86,7% de positividade em 15 carcaças de frango analisadas.

Verifica-se uma grande variação na taxa de contaminação de carcaças de frango tanto no Brasil quanto em outros países. Esta variação pode estar relacionada a inúmeros fatores que vão desde a procedência do lote, condições higiênico-sanitárias dos abatedouros, contaminação cruzada ocorrida nas áreas de depenagem, lavagem, resfriamento e embalagem. Após o processamento, durante a etapa de transporte e comercialização, as carcaças ainda estão sujeitas à contaminação adicional (FUZIHARA *et al.* 2000; CORRY *et al.* 2002).

A maioria dos trabalhos onde se pesquisou a contaminação de carcaças de frango por *Salmonella* spp., verificaram-se índices inferiores ao do presente trabalho. No Irã foi detectada contaminação de 15,6% (SALEHI *et al.*, 2005). ANTUNES *et al.* (2002), em Portugal, detectou contaminação por *Salmonella* sp. em 60%, com prevalência do sorotipo Enteritidis. Na Bélgica, UYTENDAE, *et al.* (1998) observou as taxas de contaminação de carcaças de frango de 1993 até 1996 e verificou os seguintes índices: 19,4%, 24,1%, 21,9% e 36,7%, respectivamente. Na cidade de Manaus-AM, TIROLI *et al.* (2006) detectou índice de contaminação de 50%.

A identificação dos sorotipos Typhimurium e Enteritidis dentre as cepas isoladas de carcaças de

frango, por meio de PCR multiplex, demonstrou que 28 (42,42%) das cepas foram identificadas como *S. Enteritidis* e não houve detecção de *S. Typhimurium* (Figura 2).

Na Jordânia, MALKAWI *et al.* (2004) encontrou contaminação em 30%, sendo que 49,5% das cepas isoladas foram identificadas como *S. Typhimurium* e 47, 3% pertencente ao sorotipo Enteritidis, dados estes que vão contra a tendência mundial da prevalência de *S. Enteritidis* e dos dados obtidos neste trabalho o que denota a variação dos sorotipos prevalentes em diferentes regiões do mundo. No Estado de São Paulo, SANTOS *et al.* (2000) analisaram 150 carcaças de frango congeladas, sendo detectada a presença de *Salmonella* spp. em 48 (32%) carcaças, nas quais 60,42% apresentaram o sorotipo Enteritidis.

DUARTE *et al.* (2009), no Pernambuco, encontraram índice de amostras positivadas de 9,6% das quais 25% foram identificadas como *S. Enteritidis*. BONI *et al.* (2011) realizaram a detecção de *Salmonella* em 257 amostras provenientes de várias etapas do processamento do frango em abatedouros localizados na região central de Mato Grosso do Sul, cujos resultados demonstraram que 11,28% das amostras foram positivas para *Salmonella*.

Neste trabalho, de 69 cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango, 66 foram confirmadas, quanto ao gênero, pela mPCR. Entretanto, JAMSHIDI *et al.* (2009) confirmaram todas as cepas isoladas como sendo *Salmonella*, por meio da amplificação do gene *invA*, utilizando a mesma sequência de oligonucleotídeos empregadas no presente trabalho. A não identificação de 3 cepas no presente trabalho pode estar relacionada com a possibilidade de alguns sorotipos não serem determinados por esse *primer*. Esses dados corroboram com conclusões de que RAHN *et al.* (1992) que reportaram em seu trabalho que alguns sorotipos de *Salmonella* como *S. Litchfield* e *S. Senftenberg* também não puderam ser detectados por esse *primer*.

Em relação aos resultados das análises das amostras de água provenientes da piscicultura, das 15 amostras analisadas, 11 (73,33%) foram positivas para a presença de *Salmonella* sp. (Figura 3). No entanto, não foi positiva nenhuma

amostra para os sorotipos Enteritidis ou Typhimurium. Além da carne de frango, o pescado tem sido uma alternativa de alimento saudável, nutritivo e com baixos teores calóricos. Devido às suas qualidades, seu consumo tem aumentado principalmente em regiões onde há abundância do produto, como cidades costeiras ou banhadas por rios (ALMEIDA *et al.*, 2002).

Dourados-MS, Brasil ocupa atualmente posição de destaque na produção estadual de peixes de água doce. No período de 1999/2002 a produção de pescado na região cresceu 567%, chegando a representar 62% da produção de MS no ano de 2002 (PROCHMANN, 2003). No entanto, práticas inadequadas de higiene, a falta de treinamento de funcionários, programas de nutrição inadequados, instalações mal projetadas, interferem diretamente na qualidade microbiológica da água, ocasionando a contaminação dos peixes por uma variada gama de microorganismos, tornando o pescado um importante veiculador de agentes patogênicos, dentre eles *Salmonella*, responsáveis por diversas doenças no homem. (LIUSON, 2003).

A utilização de PCR do gene *invA* é uma técnica de custo relativamente baixo e específica e tem a vantagem de obtenção de resultados dentro de algumas horas após o isolamento, em meios seletivos. A desvantagem é que a PCR do gene *invA* é capaz de identificar apenas *S. enterica* e não outras *Enterobacteriaceae* (NUCERA *et al.*, 2006).

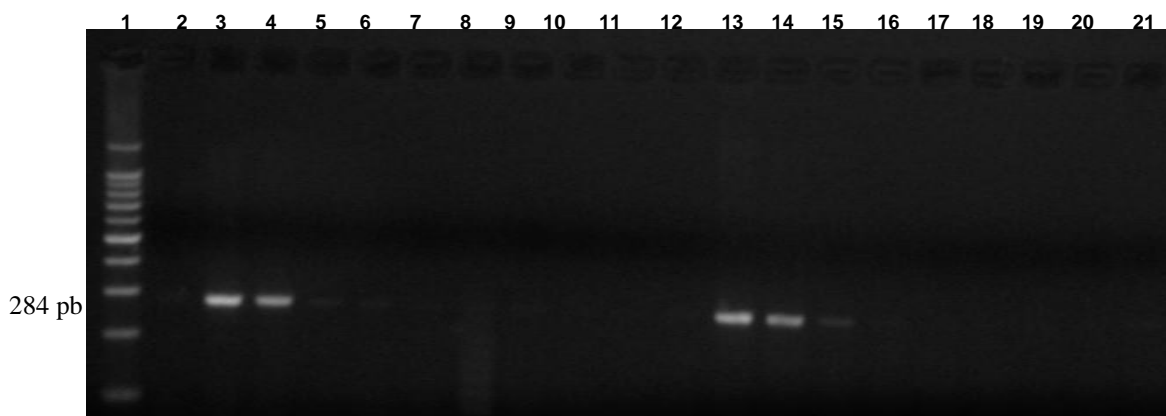
O gene *invA* de *Salmonella* contem seqüências únicas para este gênero e tem provado ser um alvo adequado para PCR com potencial para aplicação diagnóstica (RHAN *et al.*, 1992). Este gene é reconhecido como um padrão internacional para a detecção do gênero *Salmonella* e a sua amplificação foi empregada por diversos autores para a detecção de *Salmonella* sp. (MALORNY *et al.*, 2003a; MALORNY *et al.*, 2003b; JEYASEKARAN *et al.*, 2011) em carcaças de frango (OLIVEIRA *et al.*, 2002; SALEHI *et al.*, 2005; JAMSHIDI, *et al.*, 2009) e amostras ambientais (WAAGE *et al.*, 1999; SOUMET *et al.*, 1999a; SOUMET *et al.*, 1999b; MOGANEDI, *et al.*, 2007).

O gene *fliC* é responsável pela expressão de uma proteína denominada flagelina em *Salmonella* sp. (SANDERSON *et al.*, 1987). O gene *sefA*

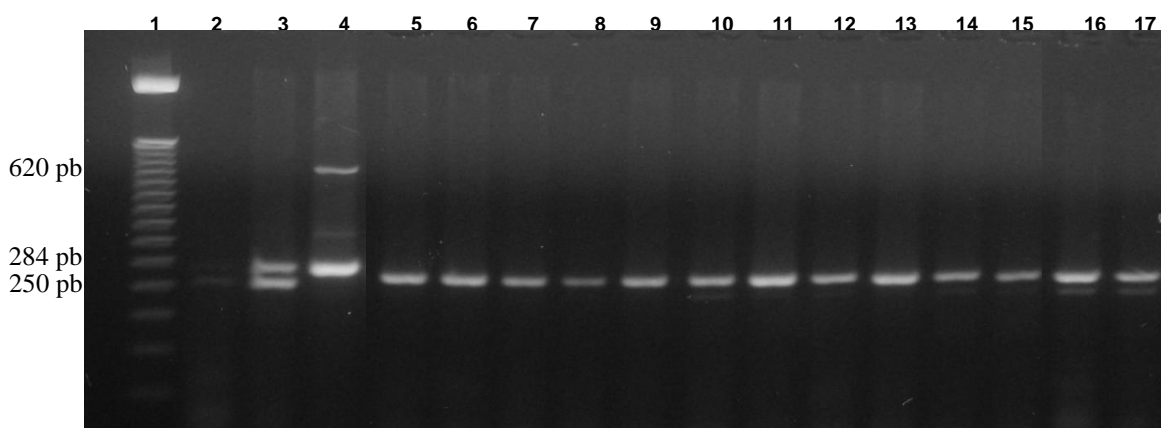
codifica a fímbria SEF14 (THORNS *et al.*, 1990; MÜLLER *et al.*, 1991) que possui especificidade única em *S. Enteritidis*, sendo sua amplificação aplicada na detecção deste sorotipo (MCLAREN *et al.*, 1992; HOORFAR & THORNS, 1996; THORNS *et al.*, 1996). Diversos autores empregaram seqüências específicas desses genes para a detecção de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (OLIVEIRA *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2002; MALKAWI *et al.*, 2004; SALEHI *et al.*, 2007; NASHWA *et al.*, 2009).

A confirmação de *Salmonella* através de PCR multiplex provê número de resultados positivos

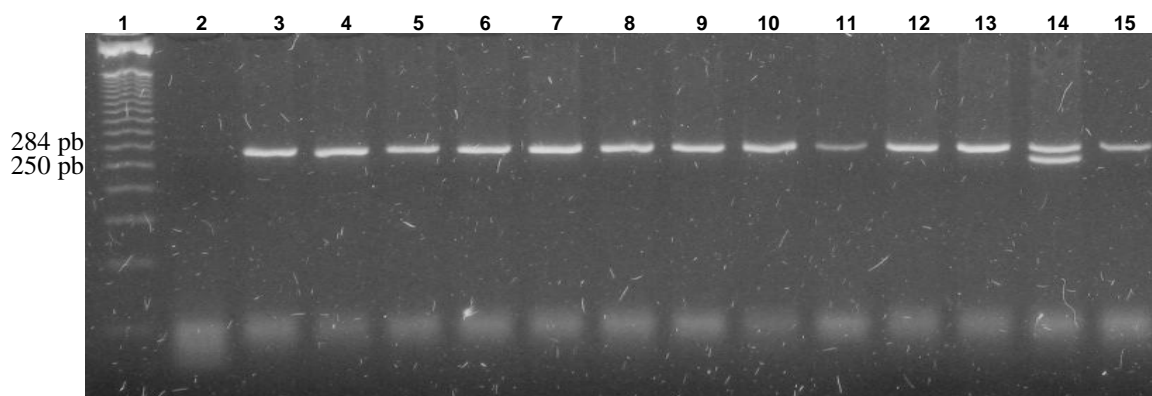
similar aquele obtido através de métodos bacteriológicos e tem reduzido o tempo de análise (SOUMET *et al.*, 1999a; JOFRE *et al.*, 2005). A amplificação simultânea de mais de uma região de DNA de interesse em uma única reação reduz o trabalho, o tempo, o custo e o risco de contaminação cruzada. Desta forma, vários autores (ALVARES *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; JAMSHIDI *et al.*, 2009; DE FREITAS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011), padronizaram PCR multiplex para a detecção e confirmação de *Salmonella* e sorotipos relevantes para segurança alimentar e saúde pública.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR para determinação de limiar de reação positiva do gene *invA* (284 pb) específico para o gênero *Salmonella*. Linha (1): marcador de peso molecular de 50 pb; Linha (2 e 12): controle negativo; Linha (3 a 11) - Água: 4,2 ng, 0,42 ng, 42 pg, 4,2 pg, 420 fg, 42 fg, 4,2 fg, 0,42 fg e 42 ag de DNA genômico, respectivamente; Linha (13 a 21) - TE: 4,2 ng, 0,42 ng, 42 pg, 4,2 pg, 420 fg, 42 fg, 4,2 fg, 0,42 fg e 42 ag de DNA genômico, respectivamente.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR multiplex para determinação das cepas do gênero *Salmonella* (gene *invA*, 284 pb) e identificação dos sorotipos Enteritidis (gene *sefA*, 250 pb) e Typhimurium (gene *fliC*, 620 pb) em cepas de carcaça de frango. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pares de bases; Linha (2): controle negativo; Linha (3): controle positivo para *Salmonella* Enteritidis; Linha (4): controle positivo *Salmonella* Typhimurium; Linha (5 a 9 e 13): amostras de carcaças de frango positivas para *Salmonella* spp.; Linha (10 a 12 e 14 a 17): amostras de carcaças de frango positivas para *Salmonella* Enteritidis.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose dos resultados da reação de PCR multiplex para determinação das cepas do gênero *Salmonella* (gene *invA*, 284 pb) e identificação do sorotipos Enteritidis (gene *sefA*, 250 pb) e Typhimurium (gene *fliC*, 620 pb) em cepas de água de piscicultura. Linha (1): marcador de peso molecular de 50 pb; Linha (2): controle negativo; Linha (3 a 13): amostras de água de piscicultura positivas para *Salmonella* spp.; Linha (14): controle positivo para *Salmonella* Enteritidis; Linha (15): controle positivo *Salmonella* sp.

Conclui-se que os índices de contaminação em carcaças de frango e amostras de água de piscicultura detectados neste trabalho são bastante elevados e indicam a necessidade de melhorar a higiene e os padrões sanitários em linhas de abate de frangos localizadas no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil e de se estabelecer controle mais eficaz da qualidade de água em pisciculturas localizadas na região da Grande Dourados-MS, Brasil. Além disso, o presente trabalho demonstrou que a técnica da PCR multiplex, empregando a amplificação dos genes alvo *invA*, *sefA* e *fliC*, após padronizada, é bastante sensível e pode ser empregada como alternativa aos testes bioquímicos e sorológicos, permitindo a rápida e confiável confirmação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium, os dois agentes mais relevantes em contaminações humanas por *Salmonella*.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).

## REFERÊNCIAS

Almeida Filho, E. S. de, Sigarini, C. de O., Ribeiro, J. N., Delmondes, E. C., Stelatto, E., Araújo Júnior, A. de. (2002). Características microbiológicas de "Pintado" (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em

supermercados e feira livre, no município de Cuiabá-MT. *Hig. Aliment.* 16(99):84-88.

Almeida, I. C., Gonçalves, P. M. R., Franco, R. M., Carvalho, J. C. A. P. (2000). Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congelados e frescos, através de método rápido. *Higiene Alimentar*, 14(70):59-62.

Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A. B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., Garaizar, J. (2004). Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 42:1734-1738.

Amini, K., Salehi, T. Z., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafganjooei, S. B. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(21), pp. 2202-2210.

Antunes, P., Réu, C., Sousa, J. C., Peixe, L., Pestana, N. (2003). Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 82, Issue 2, Pages 97-103.

APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington. 2001.

Baird-Parker, A. C. (1990). Foodborne salmonellosis. *Lancet* 336, 1231-1235.

Boni, H. F. K., Carrijo, A. S., Fascina, V. B. (2011). Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* v.12, n.1, p.84-95.

Bopp, C. A., Brenner, F. W., Fields, P. I., Wells, J. G., Stockbine, N. A. (2003). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*, p. 654-671. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Tenover, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.

- Bottezzini, I. M. P., Corso, M. P., Veit, V. M.** O uso de antibióticos na produção de frangos. Disponível em: <[http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia\\_art-tec\\_carne.htm](http://www.dipemar.com.br/carne/309/materia_art-tec_carne.htm)>. Acesso em: 12 Jan. 2010.
- Brasil.** Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informações técnicas. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31758](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758). Acesso em: 12 Mai 2011.
- Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. (2000).** Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania, USA.
- Correa, W. M. e Correa, C. N. M. (1979).** Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, J. M. Varela.
- Corry, J. L. E., Allen, V. M., Hudson, W. R., Breslin, M. F., Davies, R. H. (2002).** Sources of *salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology.*, 92:424-432.
- Cortez, A. L. L., Carvalho, A. C. F. B., Ikuno, A. A., Bürger, K. P., Vidal-Martins, A. M. C. (2006).** Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in Veterinary Science.* Volume 81, Issue 3, Pages 340-344.
- D'Aoust, J. Y. (1989).** *Salmonella*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. ed. Doyle, M.P. pp. 327-445. New York: Marcel Dekker.
- de Freitas, C. G., Santana, A. P, da Silva, P. H., Gonçalves, V. S., Barros, M. de A., Torres, F. A., Murata, L. S., Percemanis, S. (2010).** PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *Int J Food Microbiol.* 139(1-2):15-22.
- Duarte, D. A. M., Ribeiro, A. R., Vasconcelos, A. M. M., Santos, S. B., Silva, J. V. D., de Andrade, P. L. A., Falcão, L. S. P. da C. de A. (2009).** Occurrence of *Salmonella* spp. In broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology.* 40: 569-573.
- Fantasia, M., Filetici, E. (1994).** *Salmonella enteritidis* in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 7-13.
- Ferreira, A. J. P., Ito, N. M. K., Benez, S.M. (1990).** Infecção natural e experimental por *Salmonella* enteritidis em pintos. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, São Paulo. Brasil. p. 171.
- Flôres, M. L., Nascimento, V. P., Kader, I. I. T. A., Santos, L. R., Pontes, A. P., Salle, C. T. P., Lopes, R. F. F. (2001).** Métodos de extração de dna para a detecção de *salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. *Ciência Rural.* v. 31, n. 2.
- Fuzihara, T. O., Fernandes, S. A., Franco, B. D. (2000).** Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection.*, 63(12):1749-1753.
- Gillespie, B. E., Mathew, A. G., Draughon, F. A., Jayarao, B. M., Oliver, S.P. (2003).** Detection of *Salmonella* enterica somatic groups C1 and E1 by PCR-enzymelinked immunosorbent assay. *Journal of Food Protection* 66 (12): 2367-2370.
- Grimont, P. A. D., Weill, F. -X. (2007).** Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Hald, T., Wingstrand, A., Brøndsted, T., Wong, D. M. A. L. F. (2006).** Human Health Impact of *Salmonella* Contamination in Imported Soybean Products: A Semiquantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathogens and Disease* v. 3, n. 4.
- Hassanein, R., Ali, S. F. H., El-Malek, A. M. A., Moemen, A. M., Elsayh, K. I. (2011).** Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. *Veterinary World.* Vol.4 (1):5-11.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R. V. (2002).** *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129: 1-8.
- Hoorfar, J. e Thorns, C. J. (1996).** Rapid identification and serotyping of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 4, 317-320.
- Jamshidi, A., Bassami, M. R., Afshari-Nic, S. (2009).** Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella* typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int. J. Vet. Res.* 3,1:43-48.
- Jeyasekaran, G., Raj, K., Shakila, R., Thangarani, A., Sukumar, D., Jailani, V. (2011).** Rapid detection of *Salmonella enterica* serovars by multiplex PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 27, Number 4, pp. 953-959(7).
- Jofre, A. B., Martin, M., Garrigaa, M., Hugas, M., Rodriguez-Lazarp, P. D., Aymerich, T. (2005).** Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol.* 22:109-115.
- Kaku, M.; Peresi, J. T. M.; Tavechio, A. T.; Fernandes, S. A.; Batista, A. B.; Castanheira, I. A. Z.; Garcia, G. M. P.; Irino, K.; Gelli, D. S. (1995).** Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Publica.* 29:127-131.
- Kim, S., Frye, J. G., Hu, J., Fedorka-Cray, P. J., Gautom, R., Boyle, D. S. (2006).** Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *Enteric. Journal of Clinical Microbiology.* p. 3608-3615. Vol. 44, No. 10.
- Lim, Y.-H., Hirose, K., Izumiya, H., Arakawa, E., Takahashi, H., Terajima, J., Itoh, K., Tamura, K., Kim, S.-I. Watanabe, H. (2003).** Multiplex Polymerase Chain Assay for Selective Detection os *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 151-155.
- Lin, A. W., Usera, M. A., Barret, T. J., Goldsby, R. A. (1996).** Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 870-876.

- Liuson, E. (2003).** Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp. em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. 2003. 93 f. *Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)* – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mainali, C., McFall, M. E., King, R. K. (2011).** Validation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* in crops of broiler chickens. *Poult Sci.* 90:660-664.
- Malkawi, H. I., Gharaibeh, R. (2004).** Rapid and simultaneous identification of two *Salmonella enteric* serotypes, Enteritidis and Typhimurium from chicken and meat products by multiplex PCR. *Biotechnology*, 3 (1): 44-48.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003a).** Multicenter Validation of the Analytic Accuracy of *Salmonella* PCR: toward an international standard. *Applied Environmental Microbiology* 69 (1): 290-296.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbyoek, L., Bunge, C., Dorn, C., Helmuth, R. (2003b).** Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology* 89: 241-249.
- Martins, M. T., Pessoa, G. V. A., Sanchez, P. S., Sato, M. I. Z., Monteiro, C. K., Coimbra, C. A., Marques, E., Irino, K., Martins, M.T., *et al.* (1988).** Isolamento de *Salmonella* em ambiente aquático: significado sanitário. *Rev. Microbiol.* 19:29-39.
- Mclaren, I. M., Sojka, M. G., Thorns, C. J., Wray, C. (1992).** An interlaboratory trial of a latex agglutination kit for rapid identification of *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Record.* 131, 235-236.
- Miliotis, M. D., Bier, J. W. (2003).** International handbook of foodborne pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Mogamedi, K. L. M., Goyvaerts, E. M. A., Venter, S. N., Sibara, M. M. (2007).** Optimisation of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water SA.* Vol. 33 No. 2.
- Müller, K. -H., Collinson, K. S., Trust, T. J., Kay, W. W. (1991).** Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology.* 173, 4765-4772.
- Nashwa, M. H., Mahmoud, A. H., Sami, S. A. (2009).** Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction (MPCR) for Identification and Characterization of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Applied Sciences Research.* 5(12): 2343-2348.
- Nucera, D. M., Maddox, C. W., Hoiem-Dalen, P., Weigel, R. M. (2006).** Comparison of API 20E and *invA* PCR for Identification of *Salmonella enterica* Isolates from Swine Production Units. *Journal of Clinical Microbiology.* 3388-3390 Vol. 44, No. 9.
- Oliveira, S. D., Santos, L. R. D., Schuch, M. T., Silva, A. B. C., Salle, T. P., Canal, C. W. (2002).** Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87: 25-35.
- Peresi, J. T. M., Almeida, I. A. Z. C., Lima, S. I., Marques, D. F., Rodrigues, E. C. A., Fernandes, S. A., Gelli, D. S., Irino, K. (1998).** Surto de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev. Saude Publica*, 32, 477-483.
- Prochmann, A. M. (2007).** O papel do ambiente institucional e organizacional na competitividade do arranjo produtivo local da piscicultura na região de Dourados – MS. *Dissertação de Mestrado.* Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 147 p.
- Rahn, K., Degrandis, D. S., Clarke, R. C., Mcewen, S. A., Galan, J. E., Ginocchio, C., Curtiss, R. III, Gyles, C. L. (1992).** Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6:271-279.
- Rampersad, J. *et al.* (2008).** Comparison of polymerase chain reaction and bacterial culture for *Salmonella* detection in the Muscovy duck in Trinidad and Tobago. *Rev Panam Salud Publica.* vol.23, n.4, pp. 264-267.
- Rezende, C. S. M., de Mesquita, A. J., Andrade, M. A., Linhares, G. F. C., de Mesquita, A. Q., Minafra, C. S. (2005).** Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 100 (555-556) 199-203.
- Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V., Rowe, B. (1990).** International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.*, 105, 21-27.
- Salehi, T. Z., Mahzounieh, M., Saedzadeh, A. (2005).** Detection of *InvA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method. *International Journal of Poultry Science.* 4 (8): 557-559.
- Salehi, T. Z., Tadjbakhsh, H., Atashparvar, N., Nadalian, M. G., Mahzounieh, M. R. (2007).** Detection and identification of *Salmonella* Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. *Zoonoses Public Health.* 54(6-7):231-6.
- Sanderson, K. E., Hurley, J. A. (1987).** Linkage map of *Salmonella typhimurium*. pp. 70-83. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology.* Vol. I. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Santos, D. M. S., Berchieri Junior, A., Fernandes, S. A., Tavechio, A. T., Amaral, L. A. (2000).** *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq. Vet. Bras.* vol.20, n.1, pp. 39-42.
- Santos, L. R., Nascimento, V. P., Oliveira, S. D., Flôres, M. L., Pontes, A. P., Pilotto, F., Neves, N., Salle, C. T. P., Lopes, R. F. F. (2001).** Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS.* 29 (2) : 87-92.



- Silva, D. S. P., Canato, T., Magnani, M., Alves, J., Hirooka, E. Y., de Oliveira, T. C. R. M. (2011).** Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. *International Journal of Food Science e Technology*. Volume 46, Issue 7, pages 1502–1507.
- Soumet, C., Ermel, G., Rose, V. et al. (1997).** Simultaneous detection by PCR of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis from environmental samples of poultry houses. In: *Salmonella and Salmonellosis Proceedings* ed. Colin, P., Le Goux, J.M. and Clement, G. pp. 53–57. Ploufragan, France: ISPAIA.
- Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. (1999a).** Evaluation of a multiplex-PCR-based assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environment swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 113-117.
- Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. (1999b).** Identification by a multiplex-PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environment swabs poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 1-6.
- Stone, G. G., Oberst, R. D., Hays, M. P., Mcvey, S., Galland, J., Curtss, R., Kelly, S. M., Chemgappa, M. (1994).** Detection of *S.typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1292-1295.
- Tavechio, A. T., Fernandes, S., Neves, B. C., Dias, A. M. G., Irino, K. (1996).** Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 38:315-322.
- Thorns, C. J., Bell, M. M., Sojka, M. G., Nicholas, R. A. (1996).** Development and application of enzymelinked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 792–797.
- Thorns, C. J., Sojka, M. G., Chasey, D. (1990).** Detection of a novel fimbrial structure on the surface of *Salmonella enteritidis* using a monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 2409–2414.
- Tirolli, I. C. C., da Costa, C. A. (2006).** Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazonica*. vol. 36(2): 205 – 208.
- Trafny, E. A., Koztowska, K. , Szpakowska, M. (2006).** A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in human faeces. *Letters in applied microbiology*. vol. 43, nº 6, pp. 673-679.
- Turner, A. K., Lovell, M. A., Hulme, S. D., Zhang-Barber, L., Barrow, P. A. (1998).** Identification of *Salmonella typhimurium* Genes Required for Colonization of the Chicken Alimentary Tract and for Virulence in Newly Hatched Chicks. *Infect Immun.* , 66(5):2099-106.
- U.S. Department of Agriculture Economic Research Service.** Foodborne Illness Cost Calculator. *Salmonella*. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Data/FoodBorneIllness/>. Acesso em: 25 Mai 2011.
- Upadhyay, B. P, Utrarachkij, F., Thongshoob, J., Mahakunkijcharoen, Y., Wongchinda, N., Suthienkul, O., Khusmith, S. (2010).** Detection of *Salmonella Inva* Gene in Shrimp Enrichment Culture by Polymerase Chain Reaction. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 41: 426–435.
- Uyttendaele, M. R., Debevere, J. M., Lips, R. M., Neyts, K. D. (1998).** Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 40, Issues 1-2, Pages 1-8.
- Whyte, P., McGill, K., Collins, J.D., Gormely, E. (2002).** The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet. Microbiol.* 89:53–60.
- Wilson, M. A., Rimler, R. B., Hoffman, L. J. (1992).** Comparison of DNA Fingerprints and Somatic Serotypes of Serogroup B and E *Pasteurella multocida* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 1518-1524. Vol. 30, No. 6
- Woodward, M. J., Kirwan, S. E. S. (1996).** Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *Veterinary Record*.138:411-413.

### 3. CONCLUSÕES

- A porcentagem de contaminação das carcaças de frango e de água de piscicultura analisadas são alarmantes;
- Há poucos dados da contaminação de carcaças de frango em Mato Grosso do Sul, bem como qual sorotipo prevalente, o que possibilita a continuidade nas pesquisas para complementação desses dados;
- A mPCR dos gene *invA*, *fliC* e *sefA* mostrou-se uma técnica eficaz e sensível na confirmação e identificação do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium;
- Não há trabalhos em Mato Grosso do Sul que tenham realizado a detecção de *Salmonella* em água de piscicultura. Outros trabalhos podem ser desenvolvidos para complementar os dados da contaminação de água de piscicultura, bem como a contaminação da carne do pescado.

## 4. ANEXOS

### ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA *Journal of Medical Microbiology*

#### ***Journal of Medical Microbiology* Information for Authors**

Information that has changed substantially since the previous version is highlighted

#### **1.1 Scope**

##### **1.1.1 General**

The Editorial Board of the *Journal of Medical Microbiology* (JMM) wishes to publish excellent original scientific research papers or related original reviews, editorials or case reports, all of which should adhere to the following criteria. Subject matter should be within the ambit of medical microbiology, covering all types of micro-organism. Generally papers should be written from the perspective of microbiology rather than infectious disease. Basic research on the biology of pathogens, set in the context of infection or immunity, is acceptable. Host-centred topics, for example in host cell biology or immunology, will only be considered if there is a strong connection to a specific infection(s). Research findings should be novel, original and have a significant impact and are expected to go beyond purely descriptive or factual reporting of observations. For example, acceptable content might uncover underlying mechanisms or explanations of phenomena observed, or provide novel interpretation of observations. If in doubt, the Editor-in-Chief will be pleased to advise authors about eligibility prior to submission, without prejudice to the acceptance or rejection of any papers subsequently submitted.

##### **1.1.2 Types of paper**

JMM publishes papers under the following subject categories:

- Editorials
- Review articles
- Pathogenicity and virulence
- Host response
- Diagnostics, typing and identification
- Antimicrobial agents and chemotherapy
- Epidemiology
- Clinical microbiology and virology
- Veterinary microbiology
- Oral microbiology
- Models of infection
- Human and animal microbial ecology
- Case reports
- Correspondence

In reading the following guidelines, bear in mind that one full printed page comprises approximately 900 words of normal text, or an average of 500 words when tables and figures are taken into account.

**Editorials.** Editorials should be brief summaries (limit of 4 printed pages including references) of developments in fast-moving and topical areas of wide interest. They may address any subject within the scope of the JMM but the subject should not be excessively narrow or specialized; they are usually solicited but may be proffered by authors responding to a recognized need.

**Reviews.** Reviews should be brief summaries (limit of 6 printed pages excluding references) of developments in fast-moving areas. They must be based on published research articles; they may be solicited or proffered by authors responding to a recognized need.

**Case Reports.** Case Reports are brief papers describing exceptionally interesting and novel diagnoses, investigations and/or treatment of infectious diseases in humans or animals. They should not merely describe observations made or focus solely on novelty of occurrence, but rather should include new insights, explanations of mechanisms, interpretations or other aspects conveying intellectual or academic originality. Case Reports must have a Summary section, are limited to 4 printed pages including references, and may include a maximum of 2 figures and 2 tables. They need not include a review of the literature unless there is a particular reason, for example to resolve controversy.

**Correspondence.** The Correspondence section is where readers of JMM can communicate their personal observations and opinions, useful methodologies, new theories or alternative interpretations of others' work. Only articles of a high level of interest to a wide range of readers of JMM will be considered. Reports of outbreaks should be dealt with as Case Reports. Correspondence items should be no more than 2 printed pages including references, with a maximum of 1 table or figure.

## **1.2 Submission and publication requirements**

### **1.2.1 Originality, authorship and copyright**

Papers submitted must report work that has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Papers submitted to JMM that have been published preliminarily online (e.g. in Nature Precedings, Faculty of 1000 posters or PLoS Currents) will only be considered if there is a significant amount of additional novel data and analysis to warrant publication. JMM considers preliminary online publication as prior publication, and reviewers and Editors must be able to clearly identify how the paper differs from the preliminary report and that substantially more work is incorporated into the manuscript.

All the authors must have agreed to the submission, and to the order of their names on the title page. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. The corresponding author is responsible for obtaining such agreement. Requests for changes in authorship after submission must be accompanied by signed agreements from all the parties involved.

If the paper is accepted for publication in JMM, all the authors (or other copyright holder) will assign to the SGM the copyright (including electronic reproduction rights) of the paper. Neither a whole paper nor a substantial part of a paper may subsequently be published elsewhere in the same form, in any language or any medium, without the consent of the Society for General Microbiology. Click [here](#) to download a Copyright Transfer Agreement form/Licence to Publish.

### 1.2.2 Ethics

Papers describing any experimental work with humans should include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. Experiments with animals should be done in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures should be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. Papers should include details of the procedures and of anaesthetics used. The Editors will not accept papers where the ethical aspects are, in their opinion, open to doubt. Authors may wish to consult the ARRIVE guidelines for reporting *in vivo* experiments [Kilkenny *et al.* (2010). *PLoS Biol* 8(6), e1000412 doi:10.1371/journal.pbio.1000412].

### 1.2.3 Research integrity

SGM is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) and its editors operate within the COPE Code of Conduct for Journal Editors. Complaints of unethical behaviour will be investigated by SGM in line with COPE's flowcharts for such investigation. Common reasons for such investigation include:

- **Redundant (duplicate) publication.** Publication of an already published article, or a substantial portion of a published article, including unauthorized publication in translation.
- **Plagiarism.** Plagiarism is the unauthorized and/or uncredited reuse of content or ideas generated by another person. Plagiarism can occur without a breach of copyright, as it covers more than simple copying-and-pasting.
- **Breach of copyright.** The unauthorized reuse of copyright material, that is the copying of significant amounts of text or tables or figures. This can include unauthorized reuse by an author of their own material that is now copyright of another publisher. SGM makes use of the CrossCheck service to detect text duplication.
- **Fabricated data.** This can include figures that have been digitally manipulated, for example to mask gel bands or alter contrast to make certain features more or less visible or to give the impression that data from separate experiments were in fact obtained in the same experiment.
- **Problems with authorship.** Authorship problems include complaints that individuals have been inappropriately excluded from authorship or included without their knowledge, as well as accusations of guest, ghost or gift authorship.
- **Undisclosed conflict of interest.**
- **Appropriation of ideas or data by a reviewer.**

Further guidance on research integrity can be obtained from the US Office of Research Integrity.

**Conflict of interest.** A conflict of interest may exist when your interpretation of the results or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Examples of potential financial conflicts of interest include receipt of funding or salary from an organization that might gain or lose financially from publication of your paper, if you hold stocks or shares in such an organization or if you hold or are applying for a patent relating to the content of this manuscript. Examples of non-financial conflicts of interest might include political, religious or intellectual conflicts.

**Reagent sharing.** Authors of papers published in JMM are expected to make biological materials, such as strains, plasmids and antibodies, that are described for the first time in the paper available to bona fide researchers in reasonable quantities and at reasonable cost, for

non-commercial purposes. Supply of such materials must conform to current local and national laws and regulations.

**Materials and results obtained from outside the authors' laboratory.** If a paper includes results that were not obtained by the authors' own experiments (e.g. production of antibodies, properties of strains) this must be explicitly stated, and appropriate acknowledgement be included where appropriate.

#### **1.2.4 Policy on security and censorship**

The policy of SGM Council on scientific publication, security and censorship can be found [here](#).

#### **1.2.5 Author self-archiving**

Details of the SGM policy on author self-archiving can be found [here](#).

Authors may mount a PDF file of their accepted manuscript on their own or their institution's website or on a centrally organized repository, provided that the PDF is not publicly available until 12 months after online publication in the journal. The PDF file must correspond exactly to the accepted version of the manuscript. Authors may not mount a PDF of the final published version, although they should include a link to the published version. Author manuscripts must not be mounted less than 12 months after publication in the online version of JMM, nor must they be mounted on a server for the purpose of commercial sale or systematic external distribution by a third party (e.g. via an e-print server).

#### **1.2.6 Open access and PubMed Central deposition**

SGM is a signatory of the National Institutes of Health (NIH) Portfolio Agreement; as a result, papers that acknowledge funding from NIH will be deposited by SGM in PubMed Central and will be freely available from PubMed Central 12 months after publication. Because SGM has signed the Portfolio Agreement, authors are no longer able to deposit their own manuscripts in PubMed Central. Details of the SGM policy on deposit in other repositories can be found [here](#).

Authors who pay for immediate open access through our [Open Option scheme](#) will have their papers deposited in PubMed Central (and mirror sites such as UKPMC) by SGM at the time of publication with no delay to public access, in addition to their paper being freely available to all without a subscription immediately on online publication.

### **2.1 General information**

All papers must be submitted online, via the Bench>Press system (use the [Submit a Manuscript](#) link). Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Bench>Press site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Bench>Press site.

### **2.2 Pre-submission checklist**

Authors must:

1. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;
2. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
3. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
4. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
5. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be entered in the Contents Category field of the online submission form in [Bench>Press](#));
6. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
7. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
8. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;
9. upload any cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s).

### 2.3 Preparing files for submission

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. The submission system will also attempt to prepare an HTML version of the reference list with links to papers that it can identify on the PubMed and HighWire databases, for use by the reviewers. This conversion will not work reliably if the reference format is incorrect (see the the section on [References](#) for the correct style); however, an HTML reference list is not essential for review of the paper to proceed. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

**Submission as a single PDF.** Please refer to the [Help pages](#) on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

**Submission as separate word-processor and image files.** Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully convert to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT

(.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the [Help with Online Submission pages](#) for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Bench>Press system as part of an initial submission, as set out in the [Files for Publication](#) section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

## **2.4 General style and layout**

### **2.4.1 Layout**

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense. All papers should normally include: [Title page](#); [Summary \(Abstract\)](#) (not required for Editorials and Correspondence); [Acknowledgements](#); [References](#); [Tables](#); and [Figures](#), with legends. The body of Full papers should be divided into [Introduction](#); [Methods](#); [Results](#); and [Discussion](#). It is often appropriate to combine the Results and Discussion. Figures and tables should only be used to illustrate points that cannot easily be described in the text.

Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

### **2.4.2 Title page**

This should carry the following information.

- The title of the paper. The title should provide a concise statement of the contents of the paper.
- A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.
- The [Contents Category](#) for the paper.
- The names of the authors. Author names should be given in upper- and lower-case, not in all capitals, to avoid ambiguities such as 'van' and 'Van'. The author for correspondence must be clearly indicated. It is permissible to include the names of more than one author as corresponding author, but a single author must act as the point of communication during the peer review process.
- The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.
- An email address and telephone and fax numbers for the corresponding author.
- A footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.
- If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. A list of abbreviations not requiring definition is given in the [Abbreviations](#) section or in the PDF [At-a-glance style guide](#).



### **2.4.3 Summary (Abstract)**

This section is likely to be read by more people than the full paper, and many abstracting services use authors' summaries without modification. It is therefore important that this section is clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any non-standard abbreviations used must be defined.

### **2.4.4 Introduction**

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

### **2.4.5 Methods**

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason.

### **2.4.6 Results**

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated in the Results section. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

### **2.4.7 Discussion**

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

### **2.4.8 Acknowledgements**

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

## 2.4.9 References

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith *et al.* (1996) or (Smith *et al.*, 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

### **Sample journal references:**

**Cerdà-Cuéllar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997).** *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 58–61.

**Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996).** Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synapsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* **142**, 695–705.

### **Sample journal reference for more than ten authors:**

**Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997).** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547.

### **Sample reference to a whole book:**

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

### **Sample reference to a book chapter or section:**

**Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992).** Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The Evolution of Metabolic Function*, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

### **References to websites**

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- an author(s) (which may be a company name or organization);
- a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- the URL (web address) of the page;
- a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes)

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

Authors who use **EndNote** or **Reference Manager** can download the style for JMM by clicking on the links below:  
[EndNote](#)  
[Reference Manager](#)

Please note the following style points:

- References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.
- Titles of journals should be abbreviated according to the system used by [MEDLINE](#), no stops should be used after abbreviated words.
- References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.
- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

#### 2.4.10 Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols \* † ‡ § || ¶ # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

#### 2.4.11 Figures

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for inclusion as a PDF for [submission](#) and on the [source files](#) needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching. Where possible, please also supply line drawings, bar diagrams and sequence data in the original file format in which they were generated and/or as

EPS (Encapsulated PostScript), PowerPoint or CorelDraw files. Do *not* supply as PostScript files as these cannot be used.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

**Line drawings.** These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

**Bar diagrams.** Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

**Sequence data.** Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification (see section above for details). The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

JMM does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

**Photographs (halftones).** Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

#### 2.4.12 Colour figures

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

#### 2.4.13 Supplementary material

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures, movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be

included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the paper. The Editors may sometimes suggest that figures or tables that the author has included within a paper should be converted into supplementary data.

Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points. Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and be cited accordingly in the main paper. A heading and, if appropriate, a short legend or text description must be supplied for each supplementary data item.

**File types and formatting for supplementary data.** The contents of the supplementary file should be indicated in the 'File label' field when the file is uploaded. Most file types can be supported but authors should try to avoid files that require unusual software, because these will be of limited use to readers. Very large files should also be avoided where possible because they may be difficult to download. Editorial staff may apply stylistic editing to supplementary files, and will, where possible, convert the files to PDF format for online publication.

### 3.1 Nomenclature of micro-organisms

The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, must be used; if desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematics of Prokaryotes. See the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Information for Authors* for more details. Names of algae and fungi must conform with the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa must conform with the current International Code of Zoological Nomenclature.

The following may be useful:

- [List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature](#)
- [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology](#)

#### 3.1.1 Vernacular names

Generic names are singular Latin nouns and do not take a plural verb. Authors should avoid the use of a generic name alone when the reference is to the members of the genus. Thus, 'The strains (species or cultures) of *Salmonella* are...' not 'The *Salmonella* are...'. The latter implies more than one generic name *Salmonella*.

Many micro-organisms are known by their vernacular (common) names as well as by their scientific names. The vernacular name for an organism may vary from language to language or from place to place, even within the same country. There are no rules governing the use of vernacular names.

It is often convenient to use vernacular names coined from the generic names. In these forms, the initial capital letters are dropped and italics are not used. For plural forms of vernacular names, Latin or other plural endings are used, depending primarily on euphony. Thus, the vernacular singular for a member of the genus *Spirillum* is spirillum, and the plural generally used in the English language is spirilla (Latin plural), not spirillums (English plural).

Occasionally, more than one common name arises from a generic name, such as treponema (plural treponemata or treponemas) and treponeme (plural treponemes) from *Treponema*.

### 3.2 Chemical and biochemical nomenclature

Authors should follow the recommendations of IUPAC for chemical nomenclature, and those of the Nomenclature Committee of IUBMB and the IUPAC–IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature for biochemical nomenclature (see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn>).

### 3.3 Enzyme nomenclature

The system published in Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>) should be followed. Enzyme Commission numbers should be given where appropriate.

For restriction enzymes, use e.g. *EcoRI* **not** EcoRI, etc.; *HindIII* **not** *HindIII*, HindIII, *Hind III*, etc.

### 3.4 Genetic nomenclature

For bacterial gene names, use e.g. *gyrA* **not** *gyrA*; *arg-1* **not** *arg1* or *arg1*, etc.

The following proposals should be adhered to wherever possible.

Bacteria: Demerec, M. *et al.* (1966) *Genetics* **54**, 61–76 [also *J Gen Microbiol* (1968), **50**, 1–14].  
Plasmids: Novick, R. P. *et al.* (1976) *Bacteriol Rev* **40**, 168–189.  
Yeasts: Sherman, F. (1981) In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. I. Life Cycle and Inheritance, pp. 639–640 (edited by J. N. Strathern *et al.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

*Aspergillus nidulans*: Clutterbuck, A. J. (1973) *Genet Res* **21**, 291–296.  
*Neurospora crassa*: *Neurospora Newsl* (1978), **25**, 29.

### 3.5 Abbreviations

Abbreviations must be listed on title page, and defined at first mention in both Summary and main text.

The following need **not** be defined:

aa; ACES; ADA; ADP, cAMP, ATP, etc.; AIDS; BES; Bicine; bp; BSA; CAPS; c.f.u.; CHAPS; CHES; CIE; CM-cellulose; CoA; c.p.m.; Da; DEAE-cellulose; DIG; DMSO; DNA, cDNA, CCC DNA, dsDNA, ssDNA, DNase; DNP; d.p.m., d.p.s.; DTT; ED<sub>50</sub>; EDTA, EGTA; ELISA; EMS; e.o.p.; EPR or ESR; FITC; FPLC; GC or GLC; GSH, GSSG; HEPES; HEPPS; HPLC; i.d.; IEF; IgG, IgM, etc.; IPTG; IR; kb, kbp; LD<sub>50</sub>; LPS; LSU; mAb; MES; MIC; m.o.i.; MOPS; MS; NAD, NADP; NMR; nt; NTG; ONPG; ORF; PAGE; PBS; PCR; PEG; PFGE; p.f.u.; P<sub>i</sub>, PP<sub>i</sub>; PIPES; PMSF; ppGpp, pppGpp; p.p.m.; p.s.i.; PVDF; Py-GC, Py-MS; RBS; RFLP; RNA, mRNA, rRNA, tRNA, RNase; r.p.m.; RT-PCR; SDS, SDS-PAGE; SSU; TCA; TES; TLC; Tricine; Tris; UPGMA; UV; X-Gal.

## 3.6 Units

### 3.6.1 General points

SI units should be used. If non-SI units are used, the equivalent in SI units should also be given, e.g. 1 p.s.i. (6.9 kPa).

For **compound units** (e.g. micrograms per millilitre), use  $\mu\text{g ml}^{-1}$  not  $\mu\text{g/ml}$ ; use  $10 \mu\text{g ampicillin ml}^{-1}$  not  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin.

Give **concentrations** as  $\text{g l}^{-1}$ , etc., or molarity, M, **not** normality, N. The term '%' should be defined as 'w/v', 'v/v' or 'w/w' if this is necessary to avoid ambiguity.

For **radioactivity**, the preferred unit is becquerels (Bq); if given in curies (Ci), the equivalent in Bq **must** be given ( $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ ); radioactivity may also be expressed as d.p.s. ( $1 \text{ d.p.s.} = 1 \text{ Bq}$ ) or as c.p.m.

### 3.6.2 Molecular mass

$M_r$  (relative molecular mass) should be used rather than "molecular weight". "Molecular mass" should be used if values are quoted in daltons (Da) (e.g. molecular mass 20 kDa). Either  $M_r$  or molecular mass may be used, but they should not be mixed in any one paper. In table headings and figure axes, for values  $>1000$  use kDa or  $10^{-3} \times M_r$ .

### 3.6.3 Absorbance, optical density and attenuation

The term absorbance,  $A$ , should be used for the quantity  $\log(I_0/I)$  in UV and visible absorption spectrophotometry of samples in which there is negligible scattering or reflection of light. If scattering is considerable, as in spectrophotometric measurements of microbial biomass, the term optical density, OD (or attenuation,  $D$ ), should be used; the path length of the cell or cuvette, and the make and model of the spectrophotometer, should be specified, because optical design dramatically influences such measurements. If a sample is diluted prior to measuring optical density, the dilution and the diluent should be stated. Readings obtained with instruments designed for turbid samples, such as nephelometers or Klett meters, should be reported in appropriate units. Whenever  $A$ , OD or  $D$  is used, the wavelength (in nm) of the incident light must be specified (e.g.  $A_{280}$ ,  $\text{OD}_{600}$ ).

## 3.7 Presentation of nucleotide and amino acid sequences

In the absence of a detailed discussion of specific structural features, the nucleotide sequence or proposed secondary structure should not be presented. Such papers should be accompanied by substantial additional experimentation to characterize the gene(s) and products(s) concerned, and by substantial computer analysis. JMM will not normally publish DNA sequences from double-stranded genomes unless the two strands have been sequenced independently.

JMM will not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Sequence alignments of nucleic acids and proteins may be presented using the supplementary data facility.

When making comparisons between nucleotide or amino acid sequences, it is important to use the correct terminology. 'Homology' has a precise biological meaning of 'having a common evolutionary origin'. When a percentage comparison is made, the terms 'identity' or 'similarity', as appropriate, must be used.

Submitted manuscripts containing sequence data should include, on the title page, the footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000'.

#### **4.1 Editorial handling of papers**

Submitted papers are checked by the editorial staff to ensure that they comply with the journal's requirements. If any problems are noticed, the paper will be returned to the author for amendment before being assigned to an Editor. After the above step, papers are assigned by the editorial staff to an Editor with appropriate expertise, who is responsible for making the decision on acceptability; while every effort will be made to select an Editor suggested during the submission process, the editorial office staff reserve the right to assign the paper to another Editor if the one suggested is unavailable or another Editor is considered significantly more appropriate. Before sending a paper to reviewers, the Editor will pre-screen the paper to check that it fulfils certain basic criteria that would make it potentially suitable for JMM: nature of the study, quantity and quality of data, general conclusions and standard of presentation. If the paper does not fulfil these criteria, it may be rejected at this stage, so that the authors can submit the paper to a more appropriate journal without further delay. Papers that pass the pre-screening stage will normally be sent to at least one independent reviewer, but the Editor may also act as a reviewer him/herself. The use of reviewers suggested by authors is at the discretion of the Editor.

#### **4.2 Submitting a revised manuscript**

If revision of a paper is requested, the revised version should be returned within the time specified. If more time is required, the author should contact the Editorial Office ([jmm@sgm.ac.uk](mailto:jmm@sgm.ac.uk)) or Editor to discuss a new deadline. If revision is delayed by the author without prior agreement, the revised version will be treated as a new submission. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

#### **4.3 Source files for publication**

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the submission system as part of an initial submission. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

##### **4.3.1 Text**

The text (including tables, but without embedded figures) must be supplied as a word-processor file. Word files are preferred; .docx files produced in Word 2007 or 2010 can be used as source files. TeX and LaTeX formats can not be used.



### 4.3.2 Tables

Tables must **not** be supplied as image files (TIFF, PDF, PowerPoint); files containing tables prepared as images (whether provided separately or pasted into a Word file) will be returned to the author and this may delay publication. Tables should be prepared using your word-processor's table functions, with individual entries in individual table cells. They must **not** be supplied as tab- or space-separated text or as multiple entries separated by line breaks in single table cells. Tables prepared in Excel can be accepted but are not desirable.

### 4.3.3 Equations

Equations that cannot be represented using the keyboard can be prepared using the Word equation editor (in versions up to Word 2003) or MathType. Word 2007/2010 users should **not** use the default equation editor to prepare equations as it is not compatible with any other current software; equations in Word 2007/2010 should be prepared using the MathType equation editor or the 'legacy' equation editor included as part of Word (i.e. a Microsoft Equation 3.0 object, accessible from 'Insert Object' on the 'Insert' ribbon).

### 4.3.4 Line figures

Line figures should be produced as vector rather than bitmap (raster) images. Acceptable formats are PDF, EPS, CorelDRAW (.cdr; version 15 or earlier), Adobe Illustrator (.ai), Excel (.xls), Word and PowerPoint. Fonts must be embedded for figures supplied as PDF or EPS. TIFF and other bitmap formats are not recommended for line figures; if their use cannot be avoided, the resolution should be at least 600 d.p.i.

Charts prepared in Microsoft Excel should be supplied in Excel format where possible. If they are copied and pasted into another Microsoft application, use Paste Special and select 'Picture (Enhanced Metafile)'.

### 4.3.5 Halftone figures (photographs)

The preferred format for halftones (i.e. photographic images) is TIFF, but PDF, EPS and JPG/JPEG are also acceptable. If image files are pasted into Word, PowerPoint, Photoshop, etc., in order to add lettering or other annotation or **to combine line and halftone images**, the original unlabelled halftone images should also be supplied.

A final print resolution of 300 d.p.i. or more is recommended; i.e. an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. Colour images should use CMYK colour (which can be reproduced in print) rather than RGB (which cannot be reproduced faithfully using four-colour printing) (this setting can be accessed in Adobe Photoshop via Image:Mode:CMYK Color, for example). For some colour images, such as fluorescence micrographs, it may be useful to submit an RGB version of the image to be mounted online as supplementary material.

### 4.3.6 Scanning images

If images must be scanned, a resolution of 300 d.p.i. is usually sufficient for same-size reproduction of halftone (photographic) images without text, whereas 600 or 1200 d.p.i. should

be used for figures containing lines and/or text. The scanned image should be cropped to remove as much white space as possible and supplied in TIFF format.

#### **4.3.7 Supplementary material**

Files supplied as supplementary material should follow the appropriate guidelines given above. If supplementary files contain material that cannot be represented in print (sound, video, computer programs, etc.), please consult the Editorial Office for advice on suitable formats.

#### **4.4 Publication ahead of print**

JMM has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless the authors inform the Editorial Office staff ([jmm@sgm.ac.uk](mailto:jmm@sgm.ac.uk)) to the contrary, it will be assumed that they agree to their manuscript being used in this way. Please note that the PDF used for peer review, and the manuscript title, subject category and author details that authors have entered into the online submission site, will be used to generate the Papers in Press record.

#### **4.5 Proof corrections**

Proofs are sent by email as a PDF attachment to the email address supplied for the corresponding author. It is the authors' responsibility to inform the Editorial Office of any changes to this email address.

Only typographical and absolutely essential factual changes may be made. Authors may be charged for the correction of non-typographical errors.

#### **4.6 Offprints**

The corresponding author will be notified by email when offprints are available. Authors receive a voucher that will enable them to order 25 offprints free (a delivery charge applies); further copies may be purchased in multiples of 25.

Offprints of previously published papers can also be purchased from the SGM Reprint Service.

#### **4.7 Cover illustrations**

The Editors welcome the submission of pictures for possible use on the front cover, and will pay £75 towards expenses for each one used. Pictures need not be linked with a paper in the journal.