

## Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella* sp. em ovos de galinhas contaminados artificialmente\*

Ana Cristina dos Reis Ferreira<sup>1</sup> e Bernadete Miranda dos Santos<sup>2+</sup>

**ABSTRACT.** Ferreira A.C.dosR. & dos Santos B.M. [Evaluation of dna extraction methods of the *Salmonella* sp. bacterium in artificially infected chickens eggs.] Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella* sp. em ovos de galinhas contaminados artificialmente. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(2):115-119, 2015. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000, Brasil. E-mail: bmsantos@ufv.br

The present study evaluated the efficiency of different protocols for the genomic DNA extraction of *Salmonella* bacteria in chicken eggs free of specific pathogens - SPF. Seventy-five eggs were used and divided into five groups with fifteen eggs each. Three of the five groups of eggs were inoculated with enteric *Salmonella* cultures. One of the five groups was inoculated with *Escherichia coli* bacterium culture. And another group of eggs was the negative control that received saline solution 0.85% infertile. The eggs were incubated on a temperature that varied from 20 to 25°C during 24, 48 and 72 hours. Five yolks of each group were collected every 24 hours. These yolks were homogenized and centrifuged during 10 minutes. The supernatant was rejected. After the discard, PBS pH 7.2 was added and centrifuged again. The sediment obtained of each group was used for the extraction of bacterial genomic DNA. Silica particles and a commercial kit were utilized as the extraction methods. The extracted DNA was kept on a temperature of 20°C until the evaluation through PCR. The primers utilized were related with the *invA* gene and they were the following: 5' GTA AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' and 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'. The amplification products were visualized in transilluminator with ultraviolet light. The obtained results through the bacterial DNA extractions demonstrated that the extraction method utilizing silica particles was the most efficient because it obtained a DNA with good quality and sufficient quantity to get good results with the PCR technique.

**KEY WORDS.** *Salmonella*, bacteria, DNA, genome, PCR.

**RESUMO.** Avaliou-se a eficiência de três protocolos para a extração de DNA genômico de bactérias do gênero *Salmonella* em ovos de galinhas livres de patógenos específicos - SPF. Foram utilizados 75 ovos, divididos em cinco grupos com 15 ovos cada. Três grupos de ovos foram inoculados com culturas de *Salmonella* sp. Um quarto grupo foi inoculado com cultura de *Escherichia coli*. O quinto grupo

foi o controle negativo, que recebeu solução salina 0,85% estéril. Os ovos ficaram incubados na temperatura em torno de 20 - 25°C durante 24 horas. Após esse intervalo foram colhidas cinco gemas de cada grupo, as quais foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos; o sobrenadante resultante foi descartado. Após o descarte, adicionou-se PBS pH 7,2 e centrifugou-se novamente. O sedimento

\*Recebido em 7 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em 19 de março de 2014.

<sup>1</sup> Médica-veterinária. MSc. Centro Municipal de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal de Patos de Minas, Rua Major Gote 1748, Alto Caiçaras, Patos de Minas, MG 38700-001, Brasil.

<sup>2</sup> Médica-veterinária. DSc. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36571-000, Brasil. +Autora para correspondência, bmsantos@ufv.br

obtido de cada grupo foi utilizado para a extração do DNA genômico bacteriano. Os métodos utilizados de extração foram: por partículas de sílica e um kit comercial - GenElute Bacterial Genomic DNA kit. O DNA extraído foi mantido a temperatura de - 20°C até a avaliação por PCR. Os *primers* utilizados são relacionados com o gene *invA* e foram os seguintes: 5' GTA AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' and 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'. Os produtos da amplificação foram visualizados em transiluminador com luz ultravioleta. Os resultados obtidos demonstraram que o método de extração por partículas de sílica foi o mais eficiente, por obter um DNA de boa qualidade e quantidade suficiente para conseguir bons resultados na técnica de PCR.

**PALAVRAS-CHAVE.** *Salmonella*, bactéria, DNA, genoma, PCR.

## INTRODUÇÃO

O ovo é um importante produto de origem avícola e, por ser rico em nutrientes e ser de alta digestibilidade, exige alguns cuidados para que não se transforme em fonte de intoxicação alimentar e para que chegue ao consumidor com um bom padrão de qualidade. Por ser um produto perecível, deveria ser mantido sob refrigeração desde a produção até o consumo. Entretanto, este procedimento resulta em um aumento do custo de produção e conseqüentemente um aumento do custo para os consumidores.

Análises epidemiológicas têm sugerido que o consumo de ovos ou produtos contendo ovos crus contaminados são as maiores fontes de infecção em surtos de toxinfecção alimentar em que o agente etiológico é a *Salmonella* sp. (Guan et al. 2006).

Surtos de salmonelose em humanos causado por salmonelas paratíficas tem aumentado drasticamente no mundo inteiro desde a década 1980 e tornaram-se um problema importante para a indústria avícola e a saúde pública. A salmonelose é uma zoonose endêmica, que possui alta morbidade, sendo de difícil controle e erradicação (Silva & Duarte 2002). As salmonelas também são responsáveis por consideráveis prejuízos econômicos para a indústria avícola, devido a sua importância em patologia aviária (Ávila 2007).

A complexa epidemiologia da *Salmonella* na cadeia da produção de aves envolve a transmissão vertical, via ovo, desencadeando o nascimento de pintos infectados. Envolve, também, a transmissão horizontal, com a contaminação do ambiente e da ração, além da existência de diferentes espécies

animais que constituem reservatórios da bactéria (Berchieri Junior 2000).

O diagnóstico bacteriológico com isolamento e identificação da bactéria em ovos e outros produtos, é a técnica oficial recomendada pelo Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA), porém é um teste trabalhoso e demorado. A pesquisa microbiológica envolve etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento seletivo, testes bioquímicos e sorológicos. A obtenção de um resultado negativo para algum microrganismo suspeito requer cerca de quatro dias e confirmação de resultado positivo de até quinze dias. A metodologia convencional de diagnóstico apresenta outras limitações uma vez que requer um número de células viáveis suficientes para permitir o seu isolamento. Além disso, variações na morfologia e no perfil bioquímico das colônias, nos diferentes meios descritos na literatura, são fatores que aumentam a margem de erro do diagnóstico microbiológico (Campos 2005).

A utilização de técnicas de conservação de alimentos, como por exemplo, manutenção em baixas ou altas temperaturas, entre outras, pode permitir o aparecimento de células viáveis não cultiváveis, que quando da realização do teste microbiológico, não apresentam condições favoráveis a um crescimento que permita a sua identificação. Entretanto, ao permanecer em condições favoráveis a sua proliferação pode atingir doses infectantes (Floresta 2006).

Várias pesquisas têm sido realizadas visando introduzir metodologias rápidas e sensíveis para enfrentarem a agilidade que o mercado exige. Entre estas novas metodologias está a reação em cadeia da polimerase (PCR) que representa um grande avanço em termos de velocidade, sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos, e tem sido cada vez mais utilizada para identificar várias espécies bacterianas a partir de alimentos e amostras clínicas. Porém, para obtenção de bons resultados da técnica de PCR é necessário protocolos de extração de DNA práticos, rápidos e com custo baixo.

Tendo em vista essas informações, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de extração de DNA genômico de *Salmonella* sp. Por três diferentes protocolos de extração: partículas de sílica com iodeto de sódio, partículas de sílica com DNazol e um kit comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas estirpes de *Salmonella* e de *Escherichia coli*. As bactérias encontravam-se na forma liofilizada e foram ativadas em caldo de infusão de cérebro e

coração - BHI a 37°C por 18 horas. Após a ativação das bactérias, foi realizada a contagem das células bacterianas em câmara de Neubauer.

Foram utilizados 75 ovos de galinhas livres de patógenos específicos (SPF - Specific Pathogen Free), que foram divididos em cinco grupos com 15 ovos cada. O grupo controle negativo foi inoculado com solução salina a 0,85%, estéril, na quantidade de 0,1 mL. Os demais grupos foram inoculados com culturas bacterianas, dos quais três grupos foram inoculados com *Salmonella* sp. na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL e o outro grupo foi inoculado com uma cepa de *E. coli* na mesma concentração de *Salmonella* sp.

Após as inoculações, todos os grupos foram mantidos à temperatura ambiente, permanecendo por um período de 24 horas. Inicialmente, cada ovo foi desinfetado com uma solução de tintura de iodo a 10% no local da perfuração da casca. Os ovos foram perfurados com uma agulha estéril na região da câmara de ar. Inoculou-se, com auxílio de uma seringa de 1mL, 0,1mL do inóculo contendo 10<sup>5</sup> UFC por mL. Após a inoculação, os orifícios foram vedados com cola branca e os ovos incubados em temperatura ambiente.

As foram colhidas assepticamente de cada grupo, colocadas em béquer estéril e homogeneizadas. Em seguida, transferiram-se 10mL do homogeneizado de gema para tubos de centrífuga. Centrifugou-se em 2.500g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se aos sedimentos o mesmo volume do que foi descartado de solução-tampão (PBS pH 7,2); centrifugou-se novamente nas mesmas condições, descartando o sobrenadante.

O sedimento obtido de cada grupo foi armazenado a -20°C, até o momento da extração de DNA.

Nas extrações do DNA genômico bacteriano foram utilizados dois diferentes métodos: um kit comercial - *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma®) e o protocolo com extração por sílica, padronizado pelo Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o kit comercial, o protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza, por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA também foi quantificado e analisado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose. Para esse fim, um gel de agarose 1% foi preparado. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta, e as amostras foram comparadas aos padrões, determinando-se dessa maneira as concentrações aproximadas de DNA em cada amostra.

Os dois protocolos que foram utilizados para a extração do DNA usando as partículas de sílica tiveram como diferencial o uso de diferentes reagentes para a lise celular. E esses reagentes foram: DNAzol® Reagent (Invitrogen®) e solução de iodeto de sódio (NaI).

No protocolo, utilizando-se NaI, às amostras foram adicionados 600µL de iodeto de sódio sob aquecimento a 55°C e leve agitação por 5 minutos. O material obtido

foi então submetido a centrifugação por 5 minutos a 12.000g à temperatura ambiente, e o sobrenadante, coletado com auxílio de uma pipeta.

Foram, a seguir, adicionados à mistura 50 µL de suspensão de sílica (dióxido de silício - Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) e a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex. A mistura foi incubada em agitador end-over-end (Speci-Mix, Thermolyne) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 12.000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi lavado duas vezes com 1ml de tampão de lavagem (etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8). Após centrifugação por 30 segundos a 14.000 g em temperatura ambiente, todo o tampão de lavagem foi removido com auxílio de uma pipeta.

Foi adicionado 1ml de acetona e, após homogeneização no vortex, e centrifugado por 30 segundos a 14.000 X g em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta mantido a 56°C por 10 minutos.

O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50 µL de TE (5 mM TRIS-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA pH 8), incubado a 50°C por 5 minutos e o tubo centrifugado por 30 segundos a 14.000 X g a temperatura ambiente para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro Nano-Drop ND-1000. Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucléico utilizando 1 µL amostra de interesse. É ligado a um computador que analisa os dados enviados pelo aparelho e estima a quantidade de DNA na amostra em µg/µL e a qualidade do material pelo valor obtido na razão  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$ .

Com as alíquotas de cada amostra de DNA, obtidas dos dois diferentes protocolos de extração, foi realizada as reações de amplificação, com volume final de 25µl contendo: 2µl de DNA, 5 ml de tampão 10X ( 200mM Tris-HCl pH

8, 500mM KCL.) 0,3 ml de DNTP a 10mM ( Datp, dTTP, Dctp, Dgtp - Invitrogen), 2,5 ml de MgCl<sup>2</sup> a 50 mM, 1ml de cada iniciador a 25 pmol de cada , 0,3ml taq polimerase a 1U/ml e 12,9ml de água ultra pura q.s.p.

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do DNA foi sintetizado com base na sequência: 5' GTA AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3' (*primer 1*) e 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3' (*primer 2*), amplificando um fragmento de 284 pares de base do gene *invA* de *Salmonella* sp

A reação PCR foi realizada em termociclador. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 60°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de culturas puras de *Salmonella* sp. Foi utilizado um controle negativo contendo reagentes sem inclusão de uma amostra de DNA. A detecção dos pro-

duos da PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado com auxílio de um transiluminador UV.

## RESULTADOS

Os resultados relativos à concentração e pureza das amostras de DNA extraídos, de acordo com os protocolos que utilizaram as partículas de sílica estão incluídos na Tabela 1.

De acordo com a Tabela 1, todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em Espectrofotômetro Mano drop.

Neste estudo não foi possível visualizar as amostras de DNA extraídas do kit comercial, portanto, não transmite segurança quanto a certeza da extração.

Após as extrações do DNA foi realizada a PCR. Para esta técnica foram utilizados os primers iniciadores derivados do gen *invA*, obtendo uma banda de amplificação de DNA com 284 pares de base, como o esperado, em todas as amostras de DNA de *Salmonella* sp analisadas por PCR; não sendo observada nenhuma amplificação de DNA da amostra *E. coli*.

## DISCUSSÃO

Com isso, verifica-se, nessa pesquisa, que os protocolos que usaram as partículas de sílica para a separação e captação do DNA, demonstram que esta metodologia foi eficaz, simples, rápida, fácil, com boa amplificação do DNA e baixo custo (Rohland & Hofreiter 2007). Também, Boom et al. (1990),

Tabela 1. Concentração e pureza das amostras de DNA extraído, de acordo com os dois protocolos que utilizaram as partículas de sílica.

Amostra	Concentração	Pureza
S0 <sub>DNAzol</sub>	56,0 µg/µL	1,25
S1 <sub>DNAzol</sub>	56,0 µg/µL	1,03
S2 <sub>DNAzol</sub>	33,0 µg/µL	1,03
S3 <sub>DNAzol</sub>	53,6 µg/µL	1,02
EC <sub>DNAzol</sub>	59,5 µg/µL	1,02
D <sub>DNAzol</sub>	80,0 µg/µL	1,03
S0 <sub>NAI</sub>	54,0 µg/µL	1,66
S1 <sub>NAI</sub>	108,0 µg/µL	1,00
S2 <sub>NAI</sub>	90,0 µg/µL	1,03
S3 <sub>NAI</sub>	86,5 µg/µL	1,66
EC <sub>NAI</sub>	88,0 µg/µL	1,03
D <sub>NAI</sub>	56,0 µg/µL	1,05

S0<sub>DNAzol</sub>, S1<sub>DNAzol</sub>, S2<sub>DNAzol</sub>, S3<sub>DNAzol</sub> = alíquotas de gemas de ovos contaminadas com *Salmonella* sp.

EC<sub>DNAzol</sub> = alíquotas de gema de ovos contaminadas com *E.coli*.

D<sub>DNAzol</sub> = controle negativo.

S0<sub>NAI</sub>, S1<sub>NAI</sub>, S2<sub>NAI</sub>, S3<sub>NAI</sub> = alíquotas de gemas de ovos contaminadas com *Salmonella* sp.

EC<sub>NAI</sub> = alíquotas de gema de ovos contaminadas com *E.coli*.

D<sub>NAI</sub> = controle negativo.

M B D EC C<sup>+</sup> S<sub>2</sub> S<sub>3</sub> S<sub>4</sub> S<sub>5</sub> S<sub>6</sub>

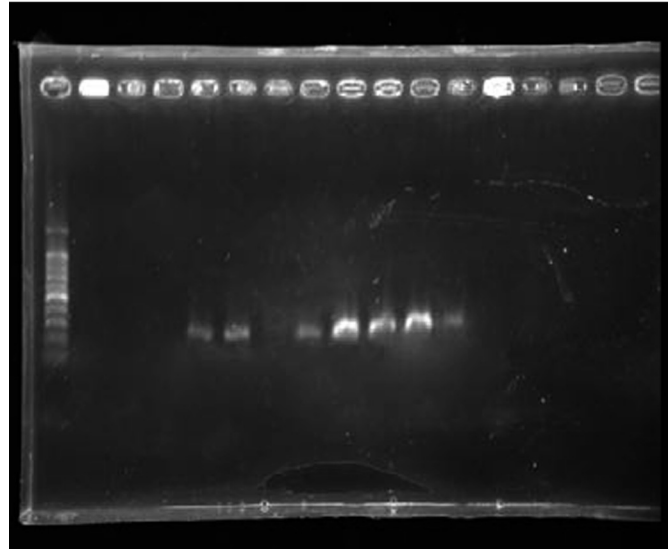


Figura 1. Resultado PCR, que utilizou o Kit GenElute Bacterial Genomic DNA para a extração do DNA bacteriano. (M = marcador 100pb, B = branco; D = diluente, EC = *E. Coli*, C<sup>+</sup> = controle positivo, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> e S<sub>6</sub> = amostras de gemas de ovos contaminadas por *Salmonella* sp.)

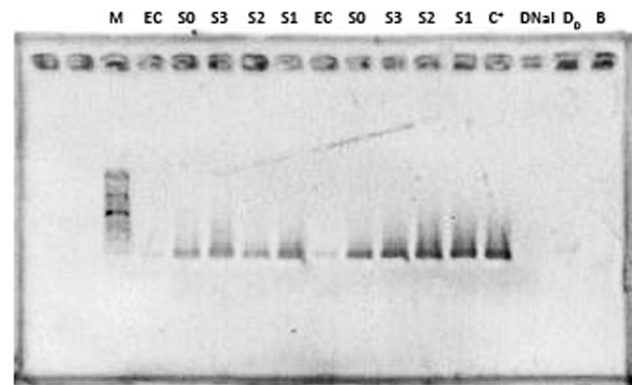


Figura 2. Resultado da PCR obtido da extração de DNA de *Salmonella* sp. em gemas de ovos contaminados artificialmente. (M = marcador de 100pb, EC = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com o reagente DNAzol de amostras de gemas de ovos contaminados por *E.Coli*, S0, S3, S2 e S1 = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com o reagente DNAzol de amostras de gemas de ovos contaminadas por *Salmonella* sp., EC<sub>2</sub> = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com iodeto de sódio de amostras de gemas de ovos contaminados por *E.Coli*, S0<sub>2</sub>, S3<sub>2</sub>, S2<sub>2</sub> e S1<sub>2</sub> = DNA extraído pelo método de partículas de sílica com iodeto de sódio de amostras de gemas de ovos contaminadas por *Salmonella* sp., C<sup>+</sup> controle positivo, D<sub>NAI</sub>, D<sub>D</sub> = controle negativo, e B = branco)

desenvolveu um protocolo utilizando partículas de sílica e agentes caotrópicos para purificação de DNA e RNA a partir de soro e urina humanos, verificando a efetividade dessas substâncias na obtenção, ruptura ou lise das membranas celulares.

Esses resultados são relevantes quando compa-

rado a outros métodos que muitas vezes utilizam compostos prejudiciais a saúde, como é o caso do fenol- clofórmio: isoamil, utilizado em outros protocolos.

Também, Mesquita et al. (2001) testaram diferentes protocolos para a extração de DNA. Em dois dos seus protocolos foram utilizada a proteinase K: em baixa concentração e por longo período de tempo; e a proteinase K em alta concentração e por curto período de tempo. Isto resultou em baixa quantidade de DNA e a alta quantidade de proteína. Este fato pode representar a causa mais provável da não amplificação pela PCR do DNA obtido com esta metodologia de extração.

Com isso, pode-se confirmar que o gene *invA* contém sequências únicas de *Salmonella* e demonstrando ser um alvo adequado para PCR, com potencial para aplicações em detecção de *Salmonella* sp.

O melhor resultado foi obtido quando o DNA foi extraído pelo método partículas de sílica associado com o NaI (Iodeto de sódio), fato evidenciado pela presença de bandas mais intensas de DNA, indicando uma maior presença de material genético. Assim, a extração de DNA por este método pode ser utilizado com segurança nos ensaios da PCR, reduzindo-se, dessa forma, os custos da técnica, principalmente no que se refere à aquisição de kits de extração de DNA.

Como verificado neste estudo e em concordância com Galán et al. (1992) e Hoorfar et al. (1999), a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas o que evita resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica. Salienta-se o *invA* é um gene comum a maioria dos sorotipos de *Salmonella*, que codifica uma proteína de invasão celular e, ausente na região correspondente de *E. coli*. Portanto, este gene é considerado eficiente para distinguir *Salmonella* de outras bactérias.

Os resultados comprovaram que os iniciadores, utilizados neste estudo, são específicos, pois não produziram sinais de amplificação com amostras de DNA de *E. coli*. Resultados semelhante foram obtidos por Santos et al. (2002), que usou iniciadores derivados do gene *invA* para avaliar a especificidade, seletividade e sensibilidade para a utilização na técnica da PCR.

Estudos conduzidos por Gallegos-Robles et al. (2009) demonstraram a amplificação do gene *invA* através da PCR para detecção de *Salmonella* em amostras de carne crua, como uma alternativa ao método convencional de cultura. Porém, foi necessária a etapa do pré-enriquecimento, para ocorrer um crescimento do microorganismo alvo e com

isso aumentar a sensibilidade da PCR. No entanto, no presente estudo, dispensou-se a etapa do pré-enriquecimento, o que não afetou a obtenção de resultados promissores e confiáveis.

## CONCLUSÕES

O uso do protocolo que utilizou as partículas de sílica associado com o iodeto de sódio e o reagente Dnazol permitiu a extração e a obtenção de um DNA genômico de *Salmonella* de qualidade satisfatória. Essa metodologia pode ser considerada também economicamente mais interessante, porque os reagentes utilizados são de preços acessíveis e comuns em laboratórios, que permite a obtenção de amostras de moléculas de DNA de *Salmonella* sp. de qualidade, diminuindo erros e repetições na etapa de amplificação, bem como gastos desnecessários com reagentes do PCR e o uso de outros kits adicionais para purificação do DNA obtido, quando comparada aos métodos convencionais disponíveis na literatura.

## REFERÊNCIAS

- Ávila L.A.F. Controle de Salmonela - um desafio para a indústria avícola brasileira. In: *Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição*. Balneário Camboriú, SC, 2007.
- Bercheri Junior A. & Freitas Neto O.C. Salmoneloses, p.435-454. In: Bercheri Junior A., Silva E.N., Di Fábio J., Sesti L. & Zuanaze M.A.F.A. (Eds), *Doenças das aves*. 3ª ed. FACTA, Campinas, 2009.
- Bomm R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen A.P.M., Wertheim P.M.E. & Noordaa J.V.D. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28:336-348, 1990.
- Campos L.C. *Microbiologia*. 4ª ed. Atheneu, São Paulo, 2005. 424p.
- Floresta F.A. *Condições para a indução do estado viável não cultivável (VNC) em Salmonella e Escherichia coli*. 1ª ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 188p.
- Galán J.E., Gunocchio 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.*, 174:4338-4349, 1992.
- Gallegos-Robles M.A., Loreto A.M., Alvarez O.J.A., Garcia O., Martinez L.A., Ramos L.H. & Fratamico P. PCR Detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. *J. Food Sci.*, 74:108-120, 2009.
- Guan I., Grenier C. & Brooks B.W. In Vitro Study of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* Definitive Type 104: Survival in Egg Albumen and Penetration through the Vitelline Membrane. *Poultry Science*, 85:1678-1681, 2006.
- Hoorfar J., Baggesen D.L. & Porting P.H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *J. Microbiol. Methods*, 35:7-84, 1999.
- Mesquita R.A., Anzai E.K., Oliveira R.N. & Nunes F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesq. Odon-tol. Bras.*, 15:124-138, 2001.
- Rohland N. & Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2:98-122, 2007.
- Santo L.R., Nascimento V.P., Oliveira S.D., Flores M.L., Pontes A.P., Pilloto F., Neves N., Salle C.T.P. & Lopes R.F.F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). *Arq. Fac. Vet.*, UFRGS, 29:87-92, 2002.
- Silva E.N. & Duarte A. *Salmonella enteritidis* em Aves: Retrospectiva no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, 4:85-100, 2002.