

AUDECIR GIOMBELLI

**MÉTODOS DE ANÁLISE E MAPEAMENTO DE
MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS E
INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NA
CRIAÇÃO E NO ABATE DE FRANGOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2013

AUDECIR GIOMBELLI

**MÉTODOS DE ANÁLISE E MAPEAMENTO DE
MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS E
INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NA
CRIAÇÃO E NO ABATE DE FRANGOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AUDECIR GIOMBELLI

**MÉTODOS DE ANÁLISE E MAPEAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS
PATOGÊNICOS E INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NA
CRIAÇÃO E NO ABATE DE FRANGOS**

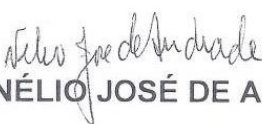
TESE APROVADA EM 27 DE MAIO DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. CLÉIA BATISTA DIAS ORNELLAS


Profa. Dra. JULIANA TEIXEIRA DE MAGALHÃES


Profa. Dra. MARIA BEATRIZ DE ABREU GLÓRIA
Orientadora e Presidente da Comissão


Prof. Dr. NÉLIO JOSÉ DE ANDRADE


Profa. Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA

*Dedico aos meus pais, mestres e amigos,
responsáveis pela minha formação
e pelo aprendizado de cada dia.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Aurora e Ambrózio pelo incentivo aos estudos.

À professora Dr^a Maria Beatriz Abreu Glória, pelos longos anos de amizade, por esta grande oportunidade e orientação em todas as etapas da realização deste trabalho.

As colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Cecília, Adriana, Regina, Patricia, Larissa, Caroline que muito me ajudaram. Aos demais colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos com quem tive breve convivência.

À Débora do laboratório de Biofísica do Instituto de Farmácia da Universidade Federal de São Paulo pela ajuda incondicional durante todo o período de testes de identificação de bactérias.

Aos professores membros da banca pelas sugestões importantes na finalização da tese.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

A todos os colegas da Pós-graduação em Ciência de Alimentos que tive a oportunidade de conhecer.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação Marilene Beatriz de Souza e Úrsula Regiane Martins pela atenção, esclarecimentos e auxílio.

A todos que contribuíram de alguma forma, para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA	19
1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO	19
1.1 PANORAMA INTERNACIONAL	19
1.2 PANORAMA NACIONAL	20
2 CARNE DE FRANGO	22
2.1 ABATE E PROCESSAMENTO	22
2.2 SISTEMAS DE QUALIDADE APLICADOS À PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO BRASIL	28
3 MICROBIOLOGIA DA CARNE DE FRANGO	33
3.1 <i>SALMONELLA</i>	36
3.1.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	36
3.1.2 <i>SALMONELLA</i> NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE	38
3.1.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i>	44
3.2 <i>CAMPYLOBACTER</i>	48
3.2.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	48
3.2.2 <i>CAMPYLOBACTER</i> NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE	49
3.3 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE EM CARNE DE FRANGO	53
3.4 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	55
PARTE EXPERIMENTAL	61
CAPÍTULO I	
COMPARAÇÃO DE TRÊS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	
1 OBJETIVO	62

2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 MATERIAL	62
2.1.1 Abatedouro.....	62
2.1.2 Coleta das carcaças.....	63
2.1.3 Preparo das carcaças para análise	63
2.2 MÉTODOS	64
2.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	65
2.2.2 Contagem de <i>E. coli</i> e coliformes totais.....	66
2.2.3 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	66
2.2.4 Contagem de aeróbios mesófilos.....	67
2.2.5 Cálculo dos resultados das contagens de micro-organismos.....	67
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS OFICIAIS DO BRASIL, UNIÃO EUROPEIA E EUA DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISE DE <i>SALMONELLA</i>	68
3.2 COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DO BRASIL, UNIÃO EUROPEIA E EUA DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISE DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE.....	77
4 CONCLUSÕES	84

CAPÍTULO II

MAPEAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS E INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ABATE DE FRANGOS

1 OBJETIVO	85
2 MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1 MATERIAL	85
2.1.1 Abatedouro.....	85
2.1.2 Coleta das carcaças.....	86
2.1.3 Coleta das amostras de água.....	87
2.2 MÉTODOS	88
2.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	88
2.2.2 Pesquisa e contagem de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. lari</i>	89
2.2.3 Contagem de <i>E. coli</i> e coliformes totais.....	90
2.2.4 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	90
2.2.5 Contagem de aeróbios mesófilos.....	91
2.2.6 Cálculos dos resultados das contagens de micro-organismos.....	91
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1 PRESENÇA DE <i>SALMONELLA</i> , <i>C. JEJUNI</i> , <i>C. COLI</i> E <i>C. LARI</i> E SUAS DISSIMINAÇÕES AO LONGO DAS PRINCIPAIS ETAPAS	

DO ABATE DE FRANGOS	92
3.2 CONTAGENS DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ABATE DE FRANGOS	99
4 CONCLUSÕES	105

CAPÍTULO III

CONTAMINAÇÃO FECAL EM CARÇAÇAS DE FRANGO: IMPLICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS PARA A SUA REMOÇÃO

1 OBJETIVO	107
2 MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1 MATERIAL	107
2.1.1 Prevalência de <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. lari</i> em lotes de frangos antes do abate, no intestino dos animais e em carcaças com diferentes condições de contaminação fecal.....	107
2.1.1.1 Granjas.....	108
2.1.1.2 Lotes e abatedouro.....	108
2.1.1.3 Coleta de amostras de cama.....	108
2.1.1.4 Coleta de amostras do intestino.....	109
2.1.1.5 Coleta de amostras de carcaças.....	109
2.1.2 Níveis de <i>E. coli</i> , coliformes totais e <i>Enterobacteriaceae</i> em carcaças de frango com diferentes condições de contaminação fecal aparente e eficiência da água em comparação com o refile para remover a contaminação.....	110
2.1.2.1 Teste piloto.....	110
2.1.2.2 Avaliação durante o abate.....	111
2.2 MÉTODOS	112
2.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	112
2.2.2 Pesquisa e contagem de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. lari</i>	114
2.2.3 Contagem de <i>E. coli</i> e coliformes totais.....	115
2.2.4 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	115
2.2.5 Cálculo dos resultados das contagens de micro-organismos.....	116
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	116
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 PREVALÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> E <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> , <i>C. COLI</i> E <i>C. LARI</i> EM LOTES DE FRANGOS ANTES DO ABATE, NO INTESTINO DOS ANIMAIS E NAS CARÇAÇAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONTAMINAÇÃO FECAL.....	117
3.2 NÍVEIS DE <i>E. COLI</i> , COLIFORMES TOTAIS E <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> EM CARÇAÇAS DE FRANGO COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONTAMINAÇÃO FECAL.....	

APARENTE E EFICIÊNCIA DA ÁGUA EM COMPARÇÃO COM O REFILE PARA REMOVER A CONTAMINAÇÃO.....	125
4 CONCLUSÕES	130
 CAPÍTULO IV	
COMPARAÇÃO DE QUATRO TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE SALMONELLA	
1 OBJETIVO	132
2 MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1 MATERIAL	132
2.1.1.1 Isolados de <i>Salmonella</i>	132
2.2 MÉTODOS	133
2.2.1 Identificação sorológica clássica.....	133
2.2.2 Identificação bioquímica com sistema automatizado.....	133
2.2.3 Identificação por espectrometria de massas.....	135
2.2.3.1 Preparo das culturas para análise.....	135
2.2.3.2 Análise.....	136
2.2.3.3 Reagentes e solventes.....	137
2.2.4 Identificação genética por ribotipagem.....	139
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	141
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
4 CONCLUSÕES	149
 CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

LISTA DE TABELAS

	Pág
REVISÃO DE LITERATURA	
1 Evolução da produção mundial de carne de frango entre 2007 e 2012.....	19
2 Variação na produção de carne de frango.....	20
3 Produção mundial e principais países produtores de carne de frango.....	20
4 Evolução dos sistemas de qualidade de alimentos.....	28
5 Pontos críticos de controle obrigatórios para abatedouros de aves no Brasil.....	32
6 Patógenos importantes em carcaças e parte de carcaças de animais.....	34
7 Diferenças de comportamento de <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i> no intestino de aves.....	35
8 Critério microbiológico para <i>Salmonella</i> em carcaças de frango no Brasil, EUA e União Europeia.....	42
9 Prevalência de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango congeladas colhidas no varejo em cinco regiões do Brasil.....	43
10 Contagem de <i>Campylobacter</i> em quatro diferentes fases do abate de frango de duas diferentes plantas de processamento.	52
11 Principais micro-organismos indicadores usados para avaliação da qualidade e higiene dos alimentos.....	54
 CAPÍTULO I	
I.1 Detecção de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango usando os procedimentos de preparo das amostras dos no Brasil, União Europeia e EUA em amostras diferentes e em uma mesma carcaça.....	69
I.2 Comparação dos resultados coincidentes e divergentes usando os procedimentos de preparo das amostras dos no Brasil, União Europeia e EUA em amostras diferentes e em uma mesma carcaça.....	70
I.3 Combinação de resultados de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça e sorotipos encontrados.....	71
I.4 Presença de <i>E. coli</i> (EC), coliformes totais (CT), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) e aeróbios mesófilos (AM) em carcaças de frango após o chiller em água usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça.....	78

I.5	Comparação de contagens de <i>E. coli</i> (EC) coliformes totais (CT), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) e aeróbios mesófilos (AM) com três procedimentos de preparo das amostras usando diferentes e uma mesma carcaça.....	80
I.6	Coeficientes de variação das contagens de <i>E. coli</i> (EC), coliformes totais (CT), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) e aeróbios mesófilos (AM) em carcaças de frango usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça.....	82
 CAPÍTULO II		
II.1	Locais de coleta de carcaças de frango durante o abate.....	86
II.2	Presença de <i>Salmonella</i> em carcaças de frango e águas do processo nas principais etapas do abate.....	94
II.3	Distribuição da presença de <i>Salmonella</i> nas principais etapas de abate de frangos e sorotipos identificados nas amostras positivas.....	97
II.4	Contagens de aeróbios mesófilos (AM), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), coliformes totais (CT) e <i>E. coli</i> (EC) em carcaças de frango colhidas em diferentes etapas do processo de abate	100
II.5	Contagens de aeróbios mesófilos (AM), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), coliformes totais (CT) e <i>E. coli</i> (EC) em águas de escaldagem, pré resfriamento e de resfriamento de carcaças...	102
 CAPÍTULO III		
III.1	Especificação da máquina de lavagem de carcaças.....	112
III.2	Níveis de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i> em carcaças com diferentes condições de contaminação fecal aparente.....	123
III.3	Contagem de <i>E. coli</i> , coliformes totais e <i>Enterobacteriaceae</i> em carcaças com diferentes condições de contaminação fecal aparente.....	126
III.4	Contagem de <i>E. coli</i> (EC), coliformes totais (CT) e <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) em carcaças de frango com contaminação fecal aparente, após o refile da contaminação fecal aparente e sem contaminação fecal aparente antes e após a lavagem com água em chuveiro com 5-6 kgf/cm ² de pressão – teste piloto.....	128
III.5	Contagem de <i>E. coli</i> (EC), coliformes totais (CT) e <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) em carcaças de frango com contaminação fecal aparente, após o refile da contaminação fecal aparente e sem contaminação fecal aparente antes e após a lavagem com água em chuveiro com 10 kgf/cm ² de pressão durante o processo.....	130

CAPÍTULO IV

IV.1	Isolados de <i>Salmonella</i> utilizados na comparação das diferentes técnicas de identificação da bactéria.....	133
IV.2	Resultados da identificação de <i>Salmonella</i> usando diferentes técnicas.....	143
IV.3	Correlação entre as técnicas testadas capazes de identificar os isolados de <i>Salmonella</i> spp. em nível de sorotipo.....	146

LISTA DE FIGURAS

	Pág
REVISÃO DE LITERATURA	
1 Principais mercados de destina da carne de frango brasileira.....	21
2 Regiões brasileiras com maiores volumes de exportação de carne de frango.....	22
3 Etapas do abate de aves.....	24
 CAPÍTULO II	
II.1 Reduções em Log ₁₀ de UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), coliformes totais (CT) e <i>E. coli</i> (EC) comparando os resultados de carcaças antes da escaldagem com os resultados de carcaças após o resfriamento.....	102
II.2 Comparação das contagens de aeróbios mesófilos (AM), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), coliformes totais (CT) e <i>E. coli</i> (EC) das carcaças após a escaldagem com as contagens da água de escaldagem.....	103
II.3 Comparação das contagens de aeróbios mesófilos (AM), <i>Enterobacteriaceae</i> (EB), coliformes totais (CT) e <i>E. coli</i> (EC) em carcaças após o resfriamento com as contagens da água de resfriamento das carcaças.....	104
 CAPÍTULO III	
III.1 Prevalência (%) de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i> em cama de granjas, intestino-ceco e carcaças em diferentes condições de contaminação fecal aparente.....	120
 CAPÍTULO IV	
IV.1 Equipamento VITEK 2 TM (bioMérieux).....	134
IV.2 Cartão usado sistema VITEK 2 TM para a identificação de <i>Salmonella</i>	135
IV.3 Placa MALDI-TOF contendo amostra e matriz.....	137
IV.4 Placa MALDI-TOF no compartimento do equipamento de espectrometria de massa Bruker Daltonik Microflex LT.....	138
IV.5 Equipamento de espectrometria de massa Bruker Daltonik Microflex LT.....	138
IV.6 Sistema de caracterização microbiana - RiboPrinter® (DuPont, Qualicon).....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AM	Aeróbios mesófilos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CFIA	Canadian Food Inspection Agency
CT	Coliformes totais
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EB	<i>Enterobacteriaceae</i>
EC	European Commission
EC	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EUA	Estados Unidos da America
FAO	Organização para a Agricultura e Alimentação
FSIS	Food Safety and Inspection Service
ISSO	International Organization for Standardization
LMR	Limite máximo de resíduo
MALDI	Matriz assisted laser desorption ionization
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Ponto de Controle
PCC	Ponto Crítico de Controle
PCR	Cadeia de reação da polimerase
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
Ppm	Parte por milhão
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido ribonucleico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TOF	Time of flight
UBABEF	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Carne de Frango
UE	União Europeia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USDA	United State Department of Agriculture
WHO	World Health Organization

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos comparar diferentes procedimentos de preparo de carcaças de frango para análises microbiológicas; mapear os micro-organismos presentes nas principais etapas do abate de frangos; avaliar as implicações microbiológicas da contaminação fecal em carcaças de frango, procedimentos para a sua remoção, bem como comparar quatro técnicas para identificar tipos de *Salmonella*. Na avaliação dos procedimentos oficiais do Brasil, da União Europeia e dos EUA para análise de *Salmonella*, foi constatado que os mesmos são equivalentes para detectar a presença da bactéria em carcaças de frango. Por outro lado, o procedimento dos EUA permitiu encontrar maiores quantidades de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*, mas foi equivalente aos demais procedimentos para a análise de aeróbios mesófilos. O mapeamento das etapas críticas de abate demonstrou que *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* não foram encontrados em nenhuma das amostras analisadas e *Salmonella* foi detectada em etapas aleatórias do processo de abate. A etapa de escaldagem reduziu a contaminação das carcaças com *Salmonella* e o resfriamento aumentou a positividade. A presença de *Salmonella* nas granjas, antes do abate, não teve relação com sua presença no intestino e nas carcaças dos animais durante o abate, mesmo em carcaças contaminadas por fezes. Por outro lado, a prevalência de *Campylobacter* em carcaças contendo fezes foi elevada e associada com contaminações nas granjas e no intestino dos animais. A lavagem das carcaças com água potável para remover a contaminação fecal foi eficiente para diminuir os níveis de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene e é um procedimento alternativo ao refil das partes contaminadas. A comparação das técnicas para identificar os sorotipos de *Salmonella* demonstrou que a bioquímica em sistema VITEK 2TM apresentou bom desempenho para identificar apenas *S. Enteritidis*. A técnica de ribotipagem apresentou 100% de correlação com a técnica sorológica e apresentou o melhor poder discriminatório para identificar e diferenciar sorotipos de *Salmonella*. A técnica de espectrometria de massas identificou os sorotipos apenas em nível de gênero e mais estudos precisam ser feitos para melhorar a aplicação desta técnica na identificação de tipos de *Salmonella*.

Palavras-chave: Carcaças de frango; *Salmonella*; *Campylobacter*; micro-organismos indicadores; contaminação fecal.

ABSTRACT

The aims of this work were to compare different sampling protocols to detect *Salmonella* and to enumerate quality and hygiene indicator microorganisms in broiler carcasses based on recommendations by legislations in Brazil, European Union and USA, to map the microorganisms present in the main stages of poultry slaughtering, to evaluate the microbiological implications of fecal contamination in poultry carcasses and procedures for removal of this contamination and to compare four techniques for *Salmonella* identification. In the evaluation of the official procedures from Brazil, European Union and USA the three protocols were equivalent in the detection of *Salmonella* in broiler carcasses. However, the USA protocol found larger amounts of *E. coli*, total coliforms, and *Enterobacteriaceae* than the others but similar counts of aerobic mesophilic. The mapping of the critical stages of slaughter showed that *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lari* were not found in any samples analyzed but *Salmonella* was detected in random phases of the slaughter process. Scalding reduced contamination of carcasses and cooling in water increased positivity. The presence of *Salmonella* on farms before slaughter was not related with its presence in the intestine of animals and in the carcasses during slaughter, even in samples contaminated by feces. On the other hand, the prevalence of *Campylobacter* in carcasses with fecal contamination was high and it was associated with its contamination on the farms and in the intestines of the birds. Washing with water to remove fecal contamination on the carcasses was efficient and decreased the levels of microorganisms indicators of quality and hygiene when compared with trimming. The comparison of techniques to identify the types of *Salmonella* showed that biochemical VITEK 2™ was efficient to identify *S. Enteritidis*, but not the other types of *Salmonella* when compared with serological ones. Ribotyping showed 100% correlation with the serological technique and had the best discriminatory power to identify and differentiate *Salmonella* isolates. Mass spectrometry identified the isolates only at genus levels and more studies need to be done to improve the application of this technique proves to identify types of *Salmonella*.

Keywords: Poultry carcasses; *Salmonella*; *Campylobacter*; indicators microorganisms; fecal contamination.

INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne de frango tem aumentado de forma significativa nos últimos anos. Segundo dados do AVISITE (2012), em 2007 foram produzidos 68,3 milhões de toneladas e em 2012 atingiu 82 milhões de toneladas, representando um aumento de 20% em cinco anos. O Brasil tem se apresentado como uma importante plataforma do agronegócio mundial, inclusive na produção avícola. A produção brasileira de carne de frango que em 1993 foi de aproximadamente 3,1 milhões de toneladas (UBABEF, 2012), atingiu em 2012 13,2 milhões de toneladas (AVISITE, 2012). O aumento na produção de carne de frango no Brasil se deve ao aumento no consumo interno e na ampliação das exportações (UBABEF, 2012).

Com a globalização na comercialização de carne de frango houve uma rápida evolução nos programas de qualidade e nas legislações nacional e internacional aplicadas à indústria avícola, como forma de garantir ao consumidor um alimento seguro. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é a ferramenta da qualidade mais utilizada atualmente para controlar os perigos biológicos, químicos e físicos dos alimentos. O Brasil estabeleceu as diretrizes do sistema de APPCC para os abatedouros de frango através da Circular 668 de 2006 (MAPA, 2006) que regulamentou um plano genérico. Nestas diretrizes, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pré-fixou quatro Pontos Críticos de Controle (PCC) entre os quais, dois são de natureza biológica: (i) a presença de contaminação gastrointestinal/biliar como indicador da presença de *Salmonella* spp, e (ii) o controle do tempo e da temperatura de resfriamento ou congelamento dos produtos para evitar a multiplicação de *Salmonella* spp. (MAPA, 2006). Porém, para se conhecer a real contaminação dos produtos devem ser feitas análises microbiológicas. No entanto, a análise de tradicional de *Salmonella* é trabalhosa e requer muito tempo para se obter o resultado, sendo que neste caso, a quantificação de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene pode ser adequada para avaliar as condições do processo e do produto final. Segundo GHAFIR, et al (2008), *E. coli* pode ser considerado um bom indicador de patógenos entéricos em carne de frango, como *Salmonella* e *Campylobacter*.

Junto com a obrigatoriedade da adoção de sistemas de APPCC na produção avícola, muitos países têm adotado análise de risco para avaliar a eficiência no controle de *Salmonella* em carcaças e carne de frango. Entre os programas os procedimentos

adotados pelo Brasil (MAPA, 2003), pelos EUA (FSIS, 2012) e pela União Europeia (EC, 2007) apresentam diferenças consideráveis no preparo das carcaças para análise de *Salmonella*. Poucos estudos estão disponíveis sobre o desempenho destes procedimentos em relação aos resultados obtidos para *Salmonella*, e também, para as contagens de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene, principalmente no que tange ao procedimento adotado pelo Brasil.

Existem distribuídos na natureza mais de 2400 sorotipos de *Salmonella* (POPOFF et al., 2004), sendo que alguns deles são mais bem adaptados às aves (BARROS DE FREITAS, 2011). Por isso, a identificação dos sorotipos de *Salmonella* detectados ao longo da cadeia de produção é importante para se conhecer as fontes de contaminação da bactéria, bem como a adoção de medidas preventivas e corretivas necessárias. Por isso, métodos de identificação rápidos e confiáveis são importantes para o setor avícola inserir medidas eficazes de controle de *Salmonella*.

Outro patógeno importante na cadeia avícola é o *Campylobacter* que se apresenta atualmente como o maior causador de toxinfecções alimentares na União Europeia, sendo a carne de frango um dos principais veículos de transmissão da bactéria ao homem (EFSA, 2012).

Os programas de qualidade aplicados numa indústria de abate e processamento de frangos devem ser dinâmicos e fornecer evidências objetivas sobre o desempenho do processo, informando quando medidas preventivas e corretivas devem ser aplicadas. Por isso, as informações microbiológicas da cadeia de produção devem relatar como o processo se comporta. A monitoria de micro-organismos patogênicos e indicadores de qualidade e higiene em uma base sistemática fornece evidências sobre o desempenho do processo. No entanto, este monitoramento deve ser feito em etapas críticas e que podem representar risco ao produto final e consequentemente aos consumidores.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: (i) comparar três diferentes procedimentos de preparo de carcaças de frango para análises microbiológicas; (ii) mapear a presença de micro-organismos patogênicos e indicadores de qualidade e higiene bem como as fontes potenciais de contaminação de carcaças nas principais etapas do abate de frangos; (iii) relacionar a prevalência de patógenos em ambientes de criação de frangos com suas presenças no intestino dos animais e nas carcaças em diferentes condições de contaminação fecal durante o abate, bem como avaliar a eficiência de dois procedimentos para a remoção da contaminação e; (iv) comparar diferentes técnicas para identificar e diferenciar isolados de *Salmonella* spp.

REVISÃO DE LITERATURA

1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO

1.1 PANORAMA INTERNACIONAL

A produção mundial de carne de frango tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Segundo dados do AVISITE (2012), a produção mundial que em 2007 foi de 68,3 milhões de toneladas, passou para 82,0 milhões de toneladas em 2012, representando um aumento de 20,0% em cinco anos. A Tabela 1 mostra a evolução da produção mundial de carne de frango entre 2007 e 2012.

Tabela 1. Evolução da produção mundial de carne de frango entre 2007 e 2012

Ano	Produção mundial (milhões de toneladas)
2007	68,3
2008	72,9
2009	73,6
2010	77,7
2011	80,4
2012	82,0

Fonte: Modificado de AVISTE (2012).

O crescimento na produção mundial de carne de frango entre 2011 e 2012 foi de 2,2%. No entanto, entre os principais países produtores, apenas nos EUA ocorreu uma desaceleração na produção na ordem de 1,8% (Tabela 2), em decorrência da crise mundial dos últimos anos e pela diminuição na última safra de produção de grãos.

Apesar da desaceleração da produção de carne de frango, os EUA continuam sendo o maior produtor, seguido da China e do Brasil. A Tabela 3 mostra o ranking dos países com maior produção de carne de frango nos anos de 2011 e 2012 bem como o percentual de cada país referente ao ano de 2012.

Tabela 2. Variação na produção mundial de carne de frangos

País produtor	Variação de produção entre 2011 e 2012
EUA	- 1,8
China	4,0
Brasil	3,0
União Europeia	1,9
Índia	10,3
México	0,9
Rússia	5,8
Argentina	4,5
Turquia	4,5
Indonésia	1,7
Tailândia	5,2
Outros Países	1,8
Total Mundial	2,2

Fonte: Modificado de AVISTE (2012).

Tabela 3. Produção mundial e principais países produtores de carne de frango

País	Milhões de toneladas		% do Total (2012)
	2011	2012	
Estados Unidos	16,7	16,4	20,0
China	13,2	13,7	16,7
Brasil	12,9	13,2	16,1
União Europeia	9,4	9,6	11,7
Índia	2,9	3,2	3,9
México	2,9	2,9	3,5
Rússia	2,6	2,7	3,3
Argentina	1,8	1,8	2,2
Turquia	1,6	1,7	2,1
Outros Países	13,6	13,9	20,5
Total Mundial	80,4	82,0	100

Fonte: Modificado de AVISITE (2012).

1.2 PANORAMA NACIONAL

Nas duas últimas décadas o Brasil tem se mostrado como uma importante plataforma do agronegócio mundial, sendo a produção de carne de frango um dos

principais produtos comercializados. A produção brasileira de carne de frango que em 1993 foi de aproximadamente 3,1 milhões de toneladas (UBABEF, 2012), atingiu em 2009, quase 12 milhões de toneladas e em 2012 a produção foi de 13,2 milhões de toneladas (AVISITE, 2012).

O aumento na produção de carne de frango no Brasil se deve a dois fatores. O primeiro é com relação ao aumento no consumo interno, sendo que do total produzido no ano de 2011, 69,8% foi consumido no Brasil. O consumo per capita da carne de frango no país aumentou 7,48% em 2011, chegando a 47,4 quilos/hab. O segundo fator que resultou no aumento da produção nacional de carne de frango é com relação às exportações. Além de estar entre os maiores produtores do mundo, o Brasil é líder mundial nas exportações desde 2004 (UBABEF, 2012). Segundo o MAPA, até 2020 a expectativa é que a produção nacional de carne de frango suprirá 48,1% do mercado mundial (MAPA, 2012).

A carne de frango do Brasil exportada tem contribuído para o aumento da receita cambial gerada por esta atividade. Em 2000 foram exportadas 906 milhões de toneladas com uma receita cambial de aproximadamente 1 milhão de dólares. Em 2009 as exportações atingiram quase 4 milhões de toneladas, sendo que em 2008 a receita cambial gerada atingiu seu mais alto patamar, com 7 milhões de dólares (UBABEF, 2012). A carne de frango brasileira está presente nas mesas de consumidores de mais de 150 países sendo o Oriente Médio, a Ásia, a União Europeia, a África, a América e a Europa extra União Europeia os principais mercados (Figura 1).

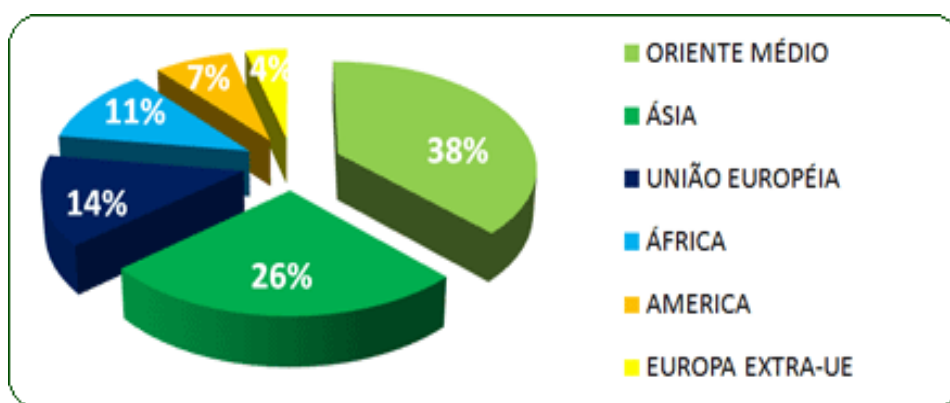


Figura 1. Principais mercados de destino da carne de frango brasileira.

Fonte: UBABEF (2012).

A região sul é a principal plataforma exportadora da carne de frango do Brasil com 74,6% do total exportado (Figura 2). Na região sul, o estado de Santa Catarina lidera o volume exportado, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul. A região Centro Oeste aparece como a segunda região com maior volume de exportação de produtos avícolas com 13,6% e a região sudeste com 11,4% (UBABEF, 2012).

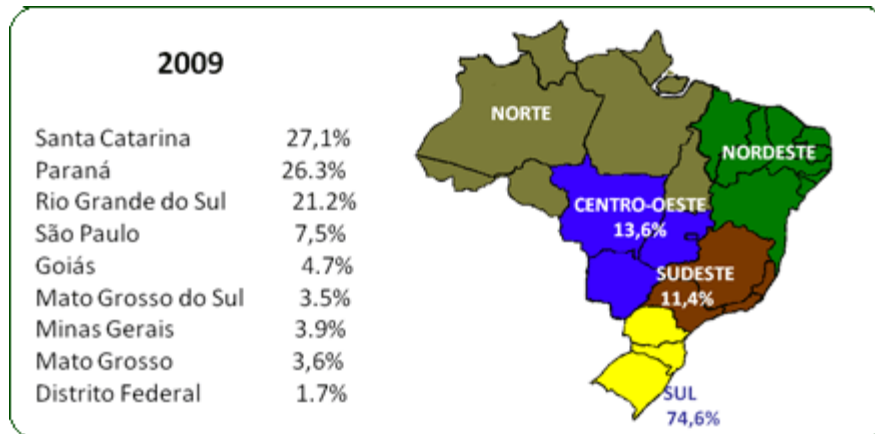


Figura 2. Regiões brasileiras com maiores volumes de exportação de carne de frango. Fonte: UBABEF (2012).

Segundo informações do MAPA (MAPA, 2012), fatores como qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade do setor avícola brasileiro. O Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo adequado nas granjas de criação dos animais, sanidade controlada, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. Todos estes requisitos resultaram em uma melhor qualidade ao produto avícola brasileiro o qual se destaca no cenário mundial.

2 CARNE DE FRANGO

2.1 ABATE E PROCESSAMENTO

No Brasil, o MAPA tem anuência sobre as diretrizes no que tange a produção de produtos de origem animal. Desta forma, as indústrias seguem os procedimentos preconizados pelas legislações referente a este tipo de produção (MAPA, 1952; MAPA, 1998; MAPA, 2005a; MAPA, 2006).

As fases do processo de abate de frangos são mostradas no fluxograma da Figura 3. As aves provenientes das granjas são transportadas em caminhões dentro de caixas e ao chegarem ao abatedouro permanecem em área de descanso até o início do abate. Ao iniciar o abate, as gaiolas contendo as aves são removidas do caminhão e colocadas sobre uma esteira transportadora e os animais são retirados das gaiolas e pendurados nos ganchos da nória transportadora (MAPA, 1998).

Posteriormente, segue-se a insensibilização que, geralmente, é feita por eletronarcolese sob imersão em água. A voltagem e amperagem devem ser proporcionais ao tamanho e peso das aves, considerando-se ainda a extensão a ser percorrida sob imersão. O atordoamento possui a finalidade de imobilização da ave durante a sangria, promovendo o relaxamento muscular e facilitando o escoamento do sangue, além de criar uma condição de inconsciência, evitando assim o acúmulo de sangue nos músculos. O sacrifício sem a prévia insensibilização só é permitido para atender preceitos religiosos ou requisitos de países importadores. A sangria deve ser completa e permitir a perda máxima do sangue para assegurar que as aves não estejam respirando ao entrarem no tanque de escaldagem. Isso evitará a entrada de água nos pulmões, prevenindo desta forma a contaminação interna da carcaça com contaminantes presentes no próprio tanque de escaldagem. Para evitar isso, o tempo mínimo exigido pelo SIF para uma sangria total é de três minutos, antes do qual não é permitida qualquer outra operação (MAPA, 1998).

Imediatamente após o término da sangria, inicia-se a etapa de escaldagem. Dois procedimentos podem ser usados nesta etapa: escaldagem por pulverização de água quente e vapor ou por imersão em tanque com água aquecida por vapor sendo este último o processo mais utilizado. A escaldagem consiste em manter as aves no tanque com água aquecida entre 52 – 63 °C por aproximadamente três minutos o que facilitará a retirada posterior das penas. O tempo e a temperatura são os parâmetros que devem ser controlados. Nesta etapa a água deve ter renovação contínua (MAPA, 1998). Depois da escaldagem, as aves passam pelo processo de depenagem, que consiste na remoção mecânica das penas. Posteriormente à depenagem, as carcaças devem ser lavadas em chuveiro de aspersão dotados de água potável (MAPA, 2007) com jatos orientados para atingir e lavar toda a carcaça, antes delas serem evisceradas.

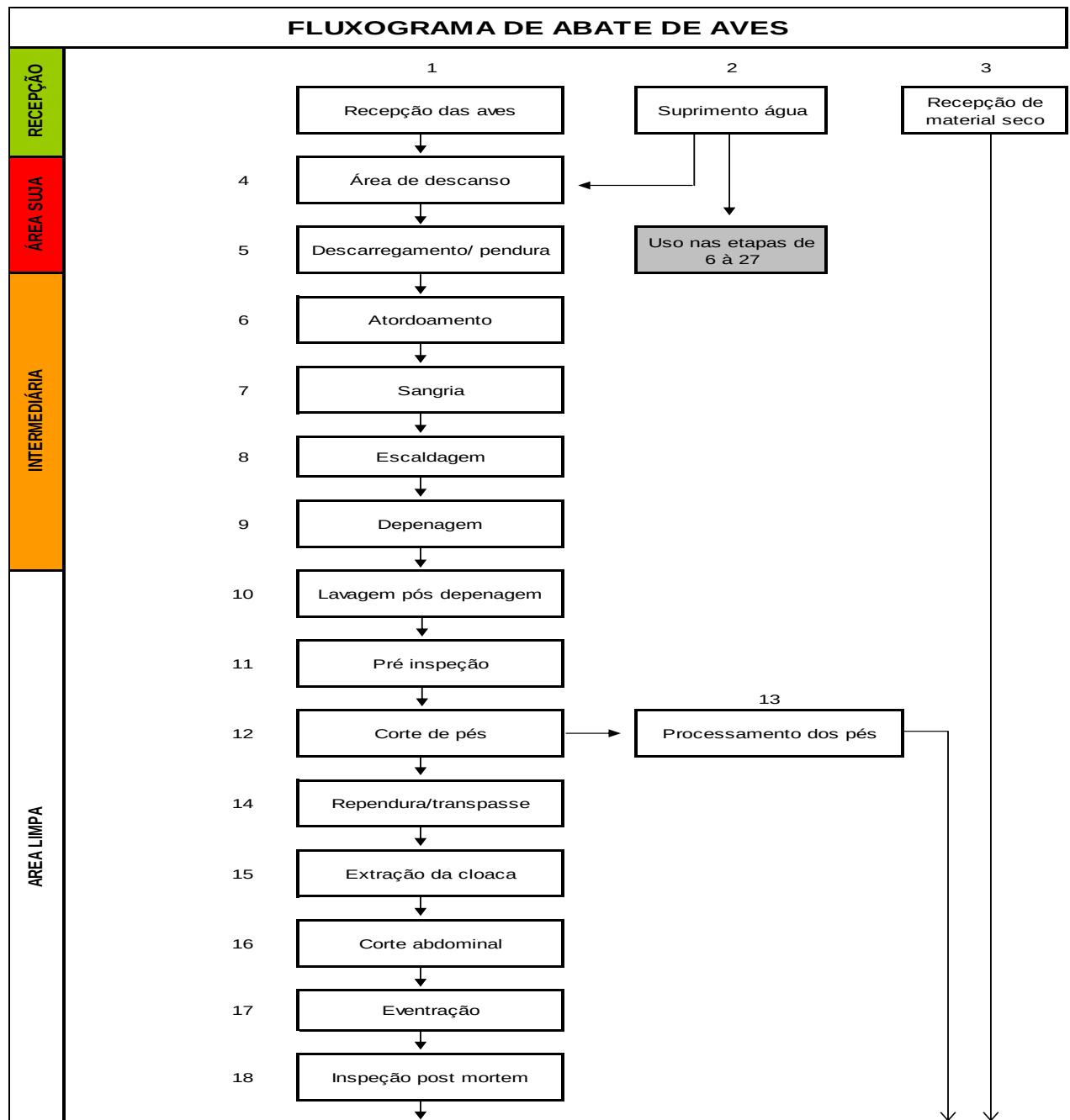


Figura 3. Etapas do abate de aves.

Fonte: MAPA (2006).

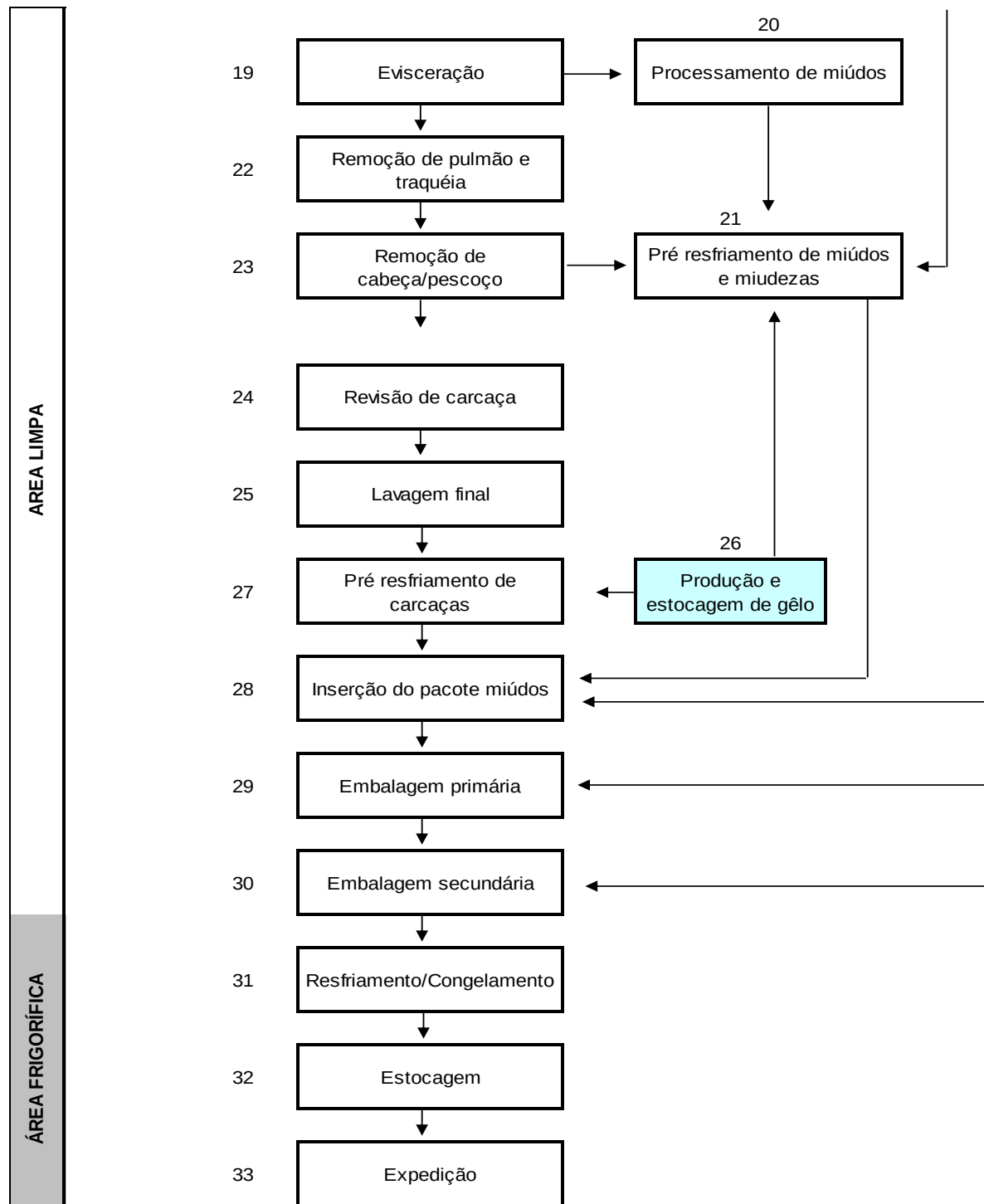


Figura 3 (continuação). Etapas do abate de aves.

Fonte: MAPA (2006).

A etapa de evisceração é crítica em decorrência das possíveis contaminações que podem ocorrer. Nesta operação, cuidados devem ser observados para evitar o

rompimento de vísceras (MAPA, 1998). Imediatamente após a evisceração, as aves são submetidas a uma etapa de revisão para identificar possível presença de contaminação gastrointestinal e/ou biliar (MAPA, 2006), sendo este controle de responsabilidade de cada empresa. Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do MAPA, as carcaças que se contaminarem com fezes durante a evisceração ou, em qualquer outra fase do abate, devem ser condenadas (MAPA, 1952).

A preocupação com o controle da contaminação fecal nas carcaças de frango está relacionada com a presença e contaminação de patógenos, o que é um problema para as indústrias, as agências reguladoras e os consumidores (MAPA, 2006; MAINALI et al., 2009). Estudo realizado por GIOTTO (2008) indicou que 2,8% das carcaças de frango eram condenadas parcialmente em decorrência de algum tipo de contaminação. Segundo o autor, a contaminação das carcaças foi a segunda maior causa da condenação total e a primeira entre as causas de condenação parcial. NASCIMENTO et al. (2012) encontraram níveis de contaminação fecal em carcaças de frango que variaram de 0,1 a 1,3%. No entanto, outros tipos de contaminações também podem ocorrer em carcaças de frango como contaminações gástrica e biliar. Para SILVA (2004), as contaminações constituem uma das principais perdas de carcaças de frangos por causas não patológicas. Segundo HERENDA e FRANCO (1996), durante todo o abate também pode ocorrer contaminação decorrente do extravasamento de conteúdo do papo, o qual é tão grave quanto à contaminação fecal.

Após a etapa de revisão, as carcaças devem ser lavadas com 1,5 L de água e posteriormente seguem para a etapa de resfriamento (MAPA, 1998). Segundo SOUZA et al. (2012), o método de resfriamento convencional nas agroindústrias brasileiras é o de imersão das carcaças em água em resfriadores contínuos, tipo rosca sem fim. De acordo com a Portaria 210 do MAPA (MAPA, 1998), o resfriamento de carcaças deve ser dividido em dois estágios. No primeiro, são utilizados 1,5 L de água por carcaça e a temperatura deve ser $\leq 16^{\circ}\text{C}$. No segundo estágio, a proporção de água é de 1 L por carcaça e a temperatura deve ser $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Com relação a temperatura das carcaças na saída do resfriamento, o MAPA estabelece que deve ser $\leq 7^{\circ}\text{C}$, podendo ser tolerado uma temperatura de até 10°C para carcaças destinadas ao congelamento imediato. A etapa de resfriamento é um dos principais pontos de contaminação

cruzada uma vez que as bactérias podem permanecer na água. Por isso, o resfriamento das carcaças deve ser rápido para evitar o crescimento microbiano (HUEZO, 2007; ZHANG et al., 2011). Desta forma, no Brasil e na União Europeia para avaliar a eficiência microbiológica do resfriamento de carcaças, deve-se rotineiramente verificar os níveis de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* na entrada e na saída do sistema de resfriamento (EC, 1992; MAPA, 2007). No Brasil, devido a proibição de uso de descontaminantes químicos no processo de abate de frangos, inclusive na etapa de resfriamento, a avaliação microbiológica também serve para verificar o uso intencional destes produtos, não sendo admitido uma redução de mais de 2 Log UFC/g entre os níveis de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* nas carcaças antes e após o sistema de resfriamento (MAPA, 2004; MAPA, 2007).

Após o resfriamento, as carcaças podem seguir dois destinos diferentes: corte ou desossa, ou embalagem de frango inteiro. Após a embalagem, os produtos são submetidos, geralmente, ao congelamento em túnel com ventilação forçada com temperaturas entre -30 °C e -35 °C por cerca de 6 h (BRESSAN et al., 2004). Após esta etapa, a carne de frango deve permanecer estocada em temperatura de -12 °C com tolerância máxima de 2 °C antes de serem expedidas para a comercialização no mercado interno (MAPA, 1998) e de -18 °C para produtos destinados a exportação (EC, 2004).

Devido à natureza dos produtos cárneos e pelas características do processo de abate, todas as etapas são potenciais fontes de contaminação microbiológica das carcaças e, conseqüentemente, do produto final. A presença de micro-organismos patogênicos nos animais vivos e que, posteriormente, podem resultar em produtos contaminados para os consumidores é uma das principais preocupações das indústrias. Adicionalmente, os níveis de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene do processo e do produto são de extrema importância para se atender os requerimentos legais que devem ser mantidos durante o abate bem como, para validar a qualidade dos produtos destinadas ao consumo. Por isso, o controle microbiológico de carcaças de frango ao longo do abate e processamento é importante para as indústrias monitorarem seus processos e tomarem ações preventivas e corretivas quando necessário.

2.2 SISTEMAS DE QUALIDADE APLICADOS À PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO BRASIL

Os sistemas de controle de qualidade de alimentos começaram a ser praticados em 1945 com a criação da Organização para Agricultura e Alimentação (FAO) sob o comando das Nações Unidas e, em 1948, com a criação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Tabela 4).

Tabela 4. Evolução dos sistemas de qualidade de alimentos

Ano	Evolução do sistema de qualidade
1945	Organização para Agricultura e Alimentação (FAO)
1947	Acordo Geral de Tarifas e Comércio
1948	Organização Mundial da Saúde (OMS)
1963	FAO/OMS Comissão do Codex Alimentarius
1994	Aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias
1995	Organização Mundial do Comércio (OMC)
1997	Documento do Codex Alimentarius sobre princípios e aplicação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

Fonte: Modificado de SPERBER (2005).

Em 1963, a FAO e a OMS criaram o Codex Alimentarius com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e para assegurar práticas justas no comércio mundial de alimentos. Um ano antes da formação da OMC, em 1994, foi criado o Acordo Sanitário e Fitosanitário para proteger a saúde das pessoas, animais e plantas. Mais recentemente, em 1997, o Codex Alimentarius publicou um documento sobre os princípios e aplicação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o qual representou um marco na gestão da qualidade e inocuidade para todos os tipos de alimentos, inclusive para carne de frango.

No Brasil, pode ser considerado que os programas oficiais de qualidade para carne de frango iniciaram em 1952 com a publicação do RIISPOA (MAPA, 1952). Nos anos seguintes, muitos avanços foram feitos na cadeia de produção de carne de frango. Em 1994, o Brasil, sensível à necessidade de garantir a qualidade dos produtos avícolas fornecidos para o mercado interno e externo, através de medidas de controle sanitário, implantou o plano nacional de sanidade avícola, com foco no controle de várias

doenças nos animais e também, visando o controle em saúde pública. Neste contexto, foi estabelecido controle de *Salmonella* Gallinarum, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (MAPA, 1994).

Em 1997, com o aumento da produção e para se tornar líder na exportação de carne de frango, o Brasil implantou a base dos atuais programas de segurança e inocuidade em carnes, em especial da carne de aves (MAPA, 1997a; MAPA, 1997b). Desta forma, a Portaria 368 (MAPA, 1997a), tornou obrigatório a adoção de BPF em todos os estabelecimentos de produção de alimentos de origem animal, enquanto que a Circular 272 (MAPA, 1997b) definiu um prazo para implantação do Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e APPCC em todos os estabelecimentos envolvidos no comércio internacional de carnes.

Em outubro de 2003, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 70, definindo os critérios para o monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* em carcaças de frangos e perus (MAPA, 2003). Desde então, todos os estabelecimentos sob o SIF estão sendo monitorados quanto à prevalência de *Salmonella* em carcaças colhidas após a etapa de resfriamento. Dentre os objetivos do programa de monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus, destacam-se:

- verificação da prevalência da *Salmonella* spp. nos produtos avícolas;
- formação de um banco de dados para análise dos índices de contaminação nos produtos avícolas;
- estabelecimento de padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação dos produtos avícolas;
- monitoramento constante do nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves; e
- aumento das garantias de inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo.

Através da publicação da Circular nº 175 (MAPA, 2005a), tornou-se obrigatório, para todos os estabelecimentos de produção de alimentos de origem animal com SIF, a implantação e manutenção de programas de autocontrole, sujeitos à verificação oficial.

Nesta circular foram definidos os elementos de inspeção necessários para manter um programa de gestão da qualidade de produtos de origem animal. Estes programas são fundamentais para o controle sanitário de alimentos, os quais são requisitos básicos para a garantia da inocuidade dos produtos de origem animal sendo que os mesmos são baseados nas exigências da legislação brasileira e dos países importadores de carne de frango.

Com base no processo de produção e na aplicação de instrumentos de gestão voltados para a qualidade do produto, os estabelecimentos de carne devem manter os seguintes programas:

- 1) manutenção das instalações e equipamentos;
- 2) vestiários, sanitários e barreiras sanitárias;
- 3) iluminação;
- 4) ventilação;
- 5) água de abastecimento;
- 6) águas residuais;
- 7) controle integrado de pragas;
- 8) limpeza e sanitização – PPHO;
- 9) higiene, hábitos higiênicos, treinamento e saúde dos operários;
- 10) procedimentos sanitários das operações;
- 11) controle de matérias primas, ingredientes e material de embalagem;
- 12) controle de temperaturas;
- 13) calibração e aferição de instrumentos de controle de processo;
- 14) verificação do programa APPCC;
- 15) testes microbiológicos (programa de redução de patógenos, testes microbiológicos para atendimentos específicos);
- 16) embasamento para certificação;
- 17) controle da adição de água nos produtos; e
- 18) bem estar animal.

No mesmo ano da publicação da Circular nº 175, a Circular nº 176 (MAPA, 2005b) contemplou as instruções para a verificação do PPHO e aplicação dos procedimentos

de verificação dos elementos de inspeção previstos na Circular nº 175, definindo os critérios a serem aplicados pelos fiscais federais, mediante os resultados obtidos nas ações de verificação oficial.

Em 2007, o MAPA publicou a Circular nº 12 (MAPA, 2007) com a finalidade de padronizar os procedimentos de fiscalização dos estabelecimentos produtores de carne de aves e ovos. Neste documento o MAPA estabeleceu a frequência de análises de produtos e do processo, bem como os tipos de análises a serem feitas.

Apesar da obrigatoriedade do uso do sistema APPCC ter sido implantado desde 1997 (MAPA, 1997b) e adotado como um dos programas de autocontrole em 2005 (MAPA, 2005a), em 2006, o MAPA identificou a necessidade de definir diretrizes gerais no que tange a aplicação do sistema APPCC para a produção de carne de aves (MAPA, 2006). Desta forma, foi publicada a Circular nº 668 (MAPA, 2006) com o modelo genérico de plano de APPCC para o processo de abate de aves. Este plano foi preparado levando-se em consideração a legislação brasileira e também dos principais mercados importadores de carnes de aves do Brasil, sobretudo da União Europeia, Canadá e de países produtores como os EUA.

A partir do plano de APPCC genérico, cada estabelecimento de abate teve que adaptar o seu plano para atender os requisitos estabelecidos na Circular 668. No entanto, o plano genérico tornou obrigatória a adoção de quatro Pontos Críticos de Controle (PCC): um de natureza química, um de natureza física e dois de natureza biológica, conforme mostrado na Tabela 5. O PCC1Q é relacionado com as informações de medicamentos usados durante a criação dos animais e o PCC1F é para controlar a presença de metais nos produtos como carcaças e cortes de aves. O PCC1B deve evitar que as carcaças com contaminação gastrointestinal e/ou biliar entrem no sistema de resfriamento. O PCC2B está focado no controle do tempo e da temperatura que os produtos devem atingir para estarem em conformidade, ou seja, devem atingir 4 °C em até 4 h. Nos dois PCC de natureza biológica o perigo indicado no plano genérico é a contaminação das carcaças com *Salmonella* e também, o controle da sua multiplicação (MAPA, 2006).

Para atendimento do PCC1B, na etapa de revisão (Figura 3, etapa 24), 100% das carcaças devem ser monitoradas pela indústria interna e externamente quanto a presença de contaminação gastrointestinal e/ou biliar. Caso seja identificada a

presença de contaminação aparente, pela inspeção visual de funcionários presentes na linha, medidas corretivas e preventivas devem ser adotadas. Como uma das medidas corretivas estabelecidas no plano genérico, deve-se remover as carcaças contaminadas da linha de abate principal para correção da não conformidade (MAPA, 2006).

Tabela 5. Pontos críticos de controle obrigatório para abatedouros de aves no Brasil

PCC	Limite crítico
Recepção das aves: PCC1Q (Presença de resíduos acima do LMR)	Tolerância zero para ausência das informações da granja quanto ao uso e retirada de drogas veterinárias dentro do prazo de carência estabelecido pelo fabricante em atendimento à legislação aplicável (Boletim sanitário)
Revisão de carcaça: PCC1B (Presença de contaminação gastrointestinal/biliar como indicador da presença de <i>Salmonella</i> spp.)	Tolerância zero para contaminação externa e interna visível por conteúdo gastrointestinal e bile nas carcaças que passaram pela etapa de revisão
Embalagem secundária: PCC1F (Presença de metais em nível inaceitável)	Presença de metais em nível inaceitável no produto
Resfriamento/ Congelamento: PCC2B (Multiplicação de <i>Salmonella</i>)	Os produtos devem atingir 4 °C em 4 h

Fonte: Modificado de MAPA (2006).

Apesar da Circular 668 (MAPA, 2006) não estabelecer como devem ser as ações corretivas para remover a contaminação gastrointestinal e/ou biliar das carcaças, o MAPA orientou que a remoção da contaminação gastrointestinal e/ou biliar das carcaças deveria ser feita pelo refile (FRANCHIN et al., 2007). A remoção da contaminação pelo refile foi a única prática adotada por todos os estabelecimentos de aves entre 2006 a outubro de 2011. Em outubro de 2011, através da Resolução nº 4, o MAPA autorizou o uso de lavagem com água potável (BRASIL, 2007) para remover a

contaminação gastrointestinal das carcaças de frango (MAPA, 2011a). Para as empresas interessadas em adotar este procedimento em suas linhas de produção para a substituição do refile como medida corretiva para o PCC 1B elas devem apresentar ao MAPA um protocolo de testes. De acordo com a Resolução nº 4, o protocolo de testes deve contemplar parâmetros mensuráveis relacionados ao processo de lavagem, de forma a comprovar o atendimento de requisitos que garantam a remoção total da contaminação por conteúdo gastrointestinal visível nas superfícies externas e internas das carcaças. Posteriormente, através da Circular nº 18 (MAPA, 2011b), o MAPA limitou o uso da lavagem apenas para a remoção de contaminação gastrointestinal, não se aplicando este procedimento para a remoção de contaminação biliar, a qual deve ser removida ainda por meio do refile.

Em 2009, objetivando o controle das principais salmonelas de importância em saúde pública no sistema de produção de aves e por se tratar de um patógeno de grande prevalência na criação avícola, o MAPA publicou a Circular nº 01 (MAPA, 2009). Esta nova regulamentação teve como finalidade determinar a prevalência de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em estabelecimentos de criação de frangos de corte e perus, o delineamento de metas para a sua redução e o atendimento de certificados sanitários internacionais.

Além das exigências legais do Brasil referente aos requisitos de qualidade e inocuidade da carne de frango destinada aos mercados internos e externos, as indústrias devem atender os requisitos dos países importadores, como por exemplo as dos países membros da União Europeia (EC, 2007). Entre essas exigências, predominam as de natureza microbiológica, principalmente em relação ao controle de *Salmonella*. O atendimento das exigências legais internas e dos países importadores é de fundamental importância para o Brasil manter sua condição de um dos principais produtores e líder nas exportações de carne de frango.

3 MICROBIOLOGIA DA CARNE DE FRANGO

A etapa de criação pode ser epidemiologicamente importante na disseminação de bactérias patogênicas entre os animais e, conseqüentemente, dar origem a produtos

contaminados (MAREMÃE et al., 2010; DONADO-GODOY et al., 2012). Os patógenos mais importantes e mais frequentemente encontrados em frangos antes do abate são *Campylobacter* e *Salmonella* (COSTA, 1996; MORAN et al., 2009; YANG et al., 2011; DONADO-GODOY et al., 2012; EFSA, 2012). Com isso, os animais destinados à produção de carnes podem ser portadores assintomáticos de patógenos (EFSA, 2012). Estes micro-organismos também podem ser encontrados nas carnes destinadas ao consumo (ARSENAULT et al., 2007; FRANCHIN et al., 2007; CHRYSTAL et al., 2008; GHAFIR et al., 2008; PEPE et al., 2009; MARAMAE et al., 2010).

Frangos, mesmo que saudáveis, entram no abatedouro carregando milhões de bactérias (CASON, 2004; CASON et al., 2007; DIONE et al., 2009) e, durante o abate, contaminações cruzadas podem ocorrer pelo contato com os equipamentos e ambiente (SMITH, 2005; RASSCHAERT et al., 2008). Durante o abate, enquanto algumas etapas do processo podem reduzir os níveis de bactérias presentes nas carcaças, outras podem contribuir para aumentá-las (BERRANG & DICKENS, 2000; ROSENQUIST et al., 2006; ZHANG et al., 2011). Na Tabela 6, são mostrados os principais patógenos de importância em carcaças e parte de carcaças *in natura* de bovino, caprino, suíno e aves.

Tabela 6. Patógenos importantes em carcaças e parte de carcaças de animais

Patógenos	Carcaças e partes de carcaças			
	Bovino	Caprino	Suíno	Aves
<i>Salmonella</i>	+	+	+	+
<i>Campylobacter</i>	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	-	-

+: importante; -: pouco importante

Fonte: FSIS (2007).

Segundo dados do Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), os micro-organismos mais importantes em carnes são *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* e *C. botulinum*. Entretanto, *Salmonella* e *Campylobacter* são os riscos biológicos potenciais quando presentes em carcaças e partes de carcaças de frango (FSIS, 2007).

Segundo MBATA (2005), o número de células de *Campylobacter* presente em carcaças de frangos após o processamento é maior do que o de *Salmonella*. Para

Campylobacter, os valores podem chegar a 10^6 UFC/carcaça e para *Salmonella*, apesar da prevalência ser elevada, as contagens geralmente são baixas (MBATA, 2005; BORSOI et al., 2010). As diferenças de comportamento da *Salmonella* e *Campylobacter* no intestino das aves estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Diferenças de comportamento de *Salmonella* e *Campylobacter* no intestino de aves

Aspectos	Comportamento	
	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>
Susceptibilidade do hospedeiro	Susceptível	Não relatada
Sítio de preferência	Ceco	Ceco
Tipo de colonização	Transiente/Intermitente	Persistente
Níveis de colonização	Variável	Elevado
Invasão	Algumas estirpes	Algumas estirpes

Fonte: Modificado de MBATA (2005).

Pelas informações apresentadas na Tabela 7, as duas principais diferenças observadas entre o comportamento de *Salmonella* e *Campylobacter* no intestino de frangos vivos são o tipo e o nível de colonização. Para *Salmonella*, o tipo de colonização pode ser temporário com períodos de presença e outros de ausência de colonização e com quantidades variadas de bactéria. Por outro lado, *Campylobacter* coloniza o intestino das aves de forma persistente e, geralmente, com grandes quantidades. Nos animais, geralmente, as infecções causadas por *Salmonella* são subclínicas e, por isso, a bactéria pode facilmente se espalhar entre as aves de um mesmo lote e estas expelirem a bactéria de forma intermitente ou persistente (EFSA, 2009).

As bactérias do trato intestinal são separadas das carcaças dos frangos quando as vísceras são removidas durante a etapa de evisceração, mas pelas características do processamento, o conteúdo gastrointestinal pode contaminar as carcaças (GIOTTO, 2008; NASCIMENTO et al., 2012). Entretanto, as bactérias que contaminam as carcaças podem estar aderidas às penas e à pele das aves (DIONE et al., 2009; MAINALI et al., 2009), mas também podem causar contaminação cruzada durante o abate e processamento (RASSCHAERT et al., 2008).

Além de patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter*, as aves levam para dentro dos abatedouros milhões de outras bactérias sendo que estas podem ser encontradas também nas carcaças e produtos derivados delas. Entre as principais bactérias encontradas nas carcaças de frango estão as de origem fecal como *E. coli*, coliformes, aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* (CASON et al., 2004; CASON et al., 2007; FRANCHIN et al., 2007; GHAFIR et al., 2008), as quais também devem ser controladas em decorrência de requisitos legais (MAPA, 2007; EC, 2007).

3.1 SALMONELLA

3.1.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A primeira identificação do gênero *Salmonella* ocorreu no final do século XIX e seu nome refere-se ao cientista Daniel Elmer Salmon (GAST, 2003). Atualmente, o gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído pelas espécies *S. bongori* e *S. enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada uma das subespécies (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. A espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* são compostas por mais de 2400 sorotipos. A distinção antigênica segue o esquema de classificação proposto por Kauffmann-White (POPOFF et al., 2004; GREMONT & WEILL, 2007). Este é um método amplamente utilizado para a caracterização das salmonelas e o mesmo baseia-se na variabilidade antigênica dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, e flagelar (H) de natureza proteica, presentes na parede celular da bactéria (BALE et al., 2007; GREMONT & WEILL, 2007). Na classificação, os sorotipos não devem ser indicados em itálico e a primeira letra deve ser maiúscula. Na prática, o nome da subespécie não precisa ser indicado, uma vez que somente os sorotipos da subespécie *enterica* têm nome (POPOFF et al., 2004). Assim, por este esquema, *Salmonella* Enteritidis passaria a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis.

Salmonella é um bacilo Gram negativo e não formador de esporos. É anaeróbio facultativo, produz gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*) e é capazes de usar o citrato como única fonte de carbono (BRENNER, et al. 2001). Pode ser móvel ou não, sendo que a maioria dos sorotipos possui flagelos peritríquios (MARTINEZ, 2006; LOUREIRO et al., 2010).

As bactérias do gênero *Salmonella* são relativamente resistentes ao calor, mas não sobrevivem à temperatura de 55 °C por 1 h ou de 60 °C por 15 a 20 min (GAMA, 2001). O crescimento das salmonelas é retardado por baixas temperaturas, por isso, o controle do tempo e temperatura, como por exemplo, 4 °C por até 4 h são parâmetros importantes na produção e comercialização de produtos avícolas (MAPA, 2006). São mesófilas, com temperatura de crescimento ótima entre 35 e 37 °C e possuem a forma de bacilos pequenos medindo 0,7 a 1,5 µm por 2,0 a 5,0 µm. A maioria dos sorotipos de *Salmonella* é produtora de gás, H₂S, são lisina e ornitina descarboxilase positivas, mas negativas para urease e indol (ISO, 2002). Em relação ao pH, a *Salmonella* cresce em intervalo de 4,5 a 9,0, com crescimento ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. Geralmente, em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 as salmonelas são eliminadas lentamente (COSTA, 1996). A atividade de água (aW) ideal é de 0,995, mas podem se multiplicar em aW de 0,93 a 0,95 (FRAZIER & WESTHOFF, 1993).

A maioria dos sorotipos de *Salmonella* está amplamente difundida na natureza, principalmente na cadeia avícola (SUMMER et al., 2004; WHITE et al., 2007; DIONE et al., 2009; BERRANG et al., 2009; BORSOI et al., 2010; EFSA, 2011; MENDONÇA, 2011). Os sorotipos de *Salmonella* são capazes de infectar uma grande variedade de animais, sendo as aves um dos mais importantes reservatórios capazes de introduzir a salmonela na cadeia alimentar do homem (EFSA, 2012). Alguns sorotipos têm seu hábitat limitado a alguns hospedeiros, sendo estes denominados de hospedeiros específicos, como por exemplo os sorotipos Typhi e Paratyphi A para seres humanos, Abortusovis para ovelhas, Gallinarum e Pullorum para aves e Choleraesuis para suínos (LOUREIRO et al., 2010). No entanto, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são os sorotipos de maior interesse em saúde animal uma vez que são os principais responsáveis por causar doenças em humanos (MAPA, 2009; EC, 2011; EFSA, 2012).

A transmissão de sorotipos de *Salmonella* pode ocorrer de diversas formas e, portanto, sua epidemiologia é bastante complexa (EFSA, 2012). *Salmonella* Enteritidis é transmitida verticalmente de ovários e ovidutos infectados para os ovos de frangas de postura. Outra via é a penetração da bactéria através da casca do ovo pelas fezes das aves quando o ovo passa pela cloaca (MINE, 2005). Segundo KOTTWITZ et al. (2007), a capacidade de transmissão transovariana da *S. Enteritidis* para os ovos resultou em uma ampla disseminação e persistência desse sorotipo na indústria avícola. Uma vez que a *Salmonella* Enteritidis atinge uma ave, esta é facilmente disseminada através das fezes (PLYM FORSHELL & WIERUP, 2006) e permanece no meio ambiente (DAVIES & WRAY, 1996; ZANCAN et al., 2000).

A transmissão de *Salmonella* aos humanos ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Os alimentos de origem animal crus ou mal cozidos, principalmente carne de frango e em especial ovos, vegetais e frutas são os mais freqüentemente envolvidos em surtos. O período de incubação é de 6 a 72 h após a ingestão do agente, havendo um desenvolvimento brusco de febre, mialgias, cefaleia e mal estar. Os sintomas principais consistem em dores abdominais, náusea, vômitos e diarreia. Comumente a salmonelose tem curso benigno e a recuperação clínica ocorre de dois a quatro dias (EFSA, 2012).

3.1.2 SALMONELLA NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE

Salmonella é o patógeno de maior importância na criação de frangos e em produtos avícolas devido ao grande impacto econômico em saúde pública (MAPA, 2003; MAPA, 2006; MAPA, 2009; EFSA, 2012). Os inúmeros estudos relatados na literatura científica mostram que a *Salmonella* tem distribuição mundial e os sorotipos encontrados na cadeia avícola variam de acordo com cada estudo.

Na União Europeia, a avaliação de amostras de cama das granjas de frango de corte, mostrou que em 2009 o percentual médio de presença de *Salmonella* foi de 5,0% com variação de zero a 32,4% entre os 27 estados membros. No ano de 2010, o percentual médio caiu para 4,1% com variação de zero a 32,9%. Entre as amostras

positivas, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram encontradas em 0,7% das amostras detectadas em 2009 e em 0,4% das amostras positivas analisadas em 2010. A União Europeia adota para estes dois sorotipos uma meta de positividade menor do que 1.0% em amostras de cama de granjas de frango de corte antes do abate. Para produtos avícolas colhidos durante o abate, o percentual médio de *Salmonella* encontrado foi de 5,3% em 2009 e 4,8% em 2010 (EFSA, 2012) sendo que em carnes *in natura* não é admitida a presença de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium (EC, 2011).

Na Colômbia, DONADO-GODOY et al. (2012) encontraram 65% das amostras de cama de granjas de frango de corte positivas para *Salmonella* entre 70 granjas analisadas. Segundo os autores, entre as amostras positivas *S. Java* foi a mais prevalente (76,4%) seguida de *S. Heidelberg* (22,7%).

No Senegal, DIONE et al. (2009) avaliaram a presença de *Salmonella* nas etapas de criação, abate e comercialização de frango. Na etapa de criação, os autores encontraram *Salmonella* em 35,1% das amostras de fezes e em 38,6% das amostras de pele. No abate, os lotes avaliados na etapa de criação resultaram em 29,8% de positividade de *Salmonella* na carne. Em amostras de carne de frango colhidas em restaurantes, foi detectado um nível de positividade de 14,3%. *Salmonella* Brancaster foi o sorotipo mais encontrado nas amostras de fezes, pele e músculo.

O transporte dos animais das granjas até o abate pode ser importante no aumento da disseminação de *Salmonella* devido a disseminação pelas fezes. MAINALI et al. (2009) constaram que 57,1% dos lotes de frango estudados estavam contaminados com *Salmonella* e que longos períodos de transporte dos animais e de espera antes do abate são importantes fatores que contribuem para o aumento de contaminação das carcaças com a bactéria.

Em carcaças de frango a presença de *Salmonella* é variável. Durante o ano de 2005 foram analisadas no Reino Unido 877 amostras foram analisadas com obtenção de uma média de positividade de 4% (MELDRUM & WILSON, 2007). No Canadá, ARSENAULT et al. (2007) estudaram a incidência e os fatores de risco associados à presença de *Salmonella* em carcaças com informações da fase de criação dos animais. Os resultados mostraram que a bactéria estava presente em 21,2% das carcaças analisadas e que o principal fator de risco associado a este fato foi a presença da bactéria no intestino dos animais.

BOSCÁN-DUQUE et al. (2007) isolaram *Salmonella* em 23% das amostras de fígado e ceco obtidas em dois abatedouros de frango da Venezuela. Cinco sorotipos diferentes foram isolados das amostras positivas sendo eles: *S. Paratyphi B* (62%), *S. Heidelberg* (31%), *S. Amager* (3%), *S. Javiana* (3%) e *S. Idikan* (1%). KEGODE et al. (2008) detectaram *Salmonella* em 4,1% de amostras de frango e os sorotipos encontrados foram *S. Kentucky*, *S. Typhimurium* var Copenhagen, e *S. Blockley*.

DALLAL et al. (2010) detectaram *Salmonella* em 86 (45,0%) de 190 amostras de carne de frango analisadas. *Salmonella* Thompson foi o sorotipo mais isolado nas amostras de carne de frango com 65 (75,0%) isolados obtidos, seguido de *S. Hadar* com 6 (7,0%), *S. Enteritidis* com 5 (5,8%), *S. Virginia* com 3 (3,5%) e *S. Paratyphi C* com 2 (92,3%). Para estes autores, o percentual de positividade e os sorotipos de *Salmonella* encontrados variam de acordo com os estudos que são realizados

O RASFF (rapid alert system for food and feed) detectou entre 01/01/12 a 30/11/12, 111 violações em produtos de aves que circularam pelos países membros da União Europeia por problemas de qualidade. Dentre elas, 51,3% foram por problemas microbiológicos, sendo a presença de *Salmonella* a principal causa (89,5%). Com relação aos produtos de aves exportados do Brasil para a União Europeia foram detectados neste mesmo período 13 violações, sendo oito por presença de *Salmonella* spp, três por *S. Enteritidis*, um por *S. Typhimurium* e um por *S. Infantis* (RASFF, 2012).

No Brasil a presença de *Salmonella* também tem sido detectada em produtos avícolas e em ambientes de abate de frangos. SANTOS et al. (2000) analisaram amostras de carcaças de frangos de quatro diferentes marcas comerciais e constataram que a bactéria estava presente em 32,0% das amostras. CARVALHO & CORTEZ (2005) detectaram *Salmonella* em 13,3% das amostras de carcaças analisadas e TIROLI & COSTA (2006) em 50% das amostras de carcaças de frango. Em estudo sobre a incidência de *Salmonella* em diferentes etapas do processamento de frangos em um abatedouro no Brasil, REITER et al. (2007) observaram que a bactéria estava presente em 5,4% das amostras testadas. As maiores contaminações por *Salmonella* estavam presentes nas gaiolas de transporte dos animais e na água de escaldagem com 16,7%; seguido de contaminações na asa congelada com 13,3%, na coxa congelada com 13,3% e na pele de peito e de coxa com 10%. Na análise de amostras do intestino, a porcentagem de positividade por *Salmonella* foi de 6,7%.

Além da presença da bactéria em carcaças e carnes de frango, *Salmonella* também pode ser encontrada em etapas do abate dos animais. CANSIAN et al. (2005) encontraram *Salmonella* em 28,6% das amostras de água de escaldagem de um abatedouro de frangos no Brasil. Segundo os autores, a temperatura da água de escaldagem durante o estudo variou de 59 °C a 62 °C, sendo esta uma faixa de temperatura inibitória para a maioria dos micro-organismos, mas sem a capacidade de eliminação total da microbiota presente devido a alta concentração de bactérias. Neste mesmo estudo os autores não encontraram a presença de *Salmonella* na água de resfriamento de carcaças, apesar da bactéria ter sido identificada em etapas anteriores do processo de abate.

Uma ação regulatória adotada nos últimos anos em vários países é a avaliação da presença de *Salmonella* em carcaças de frango após o sistema de resfriamento (MEAD et al., 2010). No Brasil, esta avaliação é feita desde 2003 (MAPA, 2003). Os EUA adotam este monitoramento desde 1996 (USDA, 1996) sendo que em 2012 houve uma revisão do programa americano, com diminuição do número de carcaças positivas de *Salmonella* admitidas em cada ciclo de amostragem (FSIS, 2012). Na União Europeia, os estados membros também avaliam a presença da bactéria em carcaças após o resfriamento e o programa europeu também passou por uma alteração recente (EC, 2011). As informações da amostragem e critério de aceitação dos programas de monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango praticado no Brasil, EUA e União Europeia são mostrados na Tabela 8.

No Brasil, por exemplo, o critério microbiológico adotado é de $n=51$ e $c=12$; sendo n o número de unidades de amostras representando um ciclo de amostragem e c o número máximo de unidades de amostras que podem conter a presença de *Salmonella* (MAPA, 2003).

Entre outubro de 2003 e julho de 2008 foram colhidas pelo SIF, 113.139 carcaças de frango após o resfriamento para avaliar a presença de *Salmonella*, referente ao programa de redução de patógenos do MAPA (MAPA, 2003). Destas, 6.860 (6,05%) continham a bactéria (MAPA, 2010). Das amostras positivas entre 2004 e 2009, 2.293 isolados foram ribotipados e identificados em nível de sorotipo. Nesta avaliação foram identificados 14 diferentes sorotipos de *Salmonella*, sendo que *S. Enteritidis* foi a mais prevalente com 47,7%, seguida de *S. Typhimurium* com 9,03% e de *S. Agona* com

5,32%. Os demais sorotipos de *Salmonella* encontrados tiveram prevalências abaixo de 5,0%. Entre os isolados, 1.361 (59,3%) foram oriundos de carcaças de frango colhidas da região sul do Brasil. Destas amostras, 54,04% foram identificadas como sendo *S. Enteritidis*, 5,70% como *S. Agona* e 5,36% como *S. Typhimurium* (BARROS DE FREITAS, 2011).

Tabela 8. Critério microbiológico para *Salmonella* em carcaças de frango no Brasil, EUA e União Europeia

Países	Número de amostras testadas por ciclo	Número máximo de amostras positivas aceitável
Brasil ¹	51	12
União Europeia ²	50	5
EUA ³	51	8

Fontes: ¹ MAPA (2003); ² EC (2011); ³ FSIS (2012).

Na União Europeia, durante o ano de 2008, 15,6% de carcaças colhidas após o resfriamento estavam positivas para *Salmonella*. No entanto, entre os estados membros, a variação da prevalência de *Salmonella* variou de 0% a 85,6%. Em 2007, a positividade encontrada entre os países membros foi de 1,0% na Romênia a 43,5% na Hungria. Em países como a Dinamarca, Finlândia, Irlanda e Noruega, com programas bem consolidados para controlar *Salmonella* em carne de frango, os percentuais de presença de *Salmonella* são bastante baixos. Os sorotipos de *Salmonella* mais encontrados em carcaças de frango durante o ano de 2007 na União Europeia foram: *S. Kentucky*, *S. Enteritidis*, *S. Paratyphi B*, *S. Java*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow*, *S. Agona*, *S. Ohio*, e *S. Indiana*, apesar de uma grande quantidade de isolados não terem sido identificados (EFSA, 2009). Em 2009 a variação de positividade de *Salmonella* em carcaças de frango na União Europeia foi de 0,0% a 68,0% e em 2010 foi de 0,0% a 24,0%. A Estônia foi o país onde *Salmonella* não foi encontrada entre as amostras analisadas e a Hungria foi o país com maior prevalência. Em relação aos sorotipos encontrados em carne de frango, no ano de 2010 *S. Infantis* foi o mais prevalente com 58,8% dos isolados, seguido de *S. Kentucky* com 5,7%, *S. Enteritidis* com 4,3%, de *S. Java* com 4,6% e *S. Bredney* e *S. Muenchen*, ambas com 2,1% (EFSA, 2012).

Nos EUA, no ano de 2011 foram analisadas 4.897 carcaças de frango referente ao programa americano de redução de patógenos. Destas, 315 (6,4%) estavam positivas para *Salmonella* (FSIS, 2012). Os resultados dos EUA não podem ser comparados com os do Brasil e da UE, pois naquele país é utilizado descontaminante de carcaças na etapa de resfriamento, enquanto que na União Europeia e no Brasil esta prática não é permitida (MAPA, 2004; EC, 2004).

No Brasil, a presença de *Salmonella* em produtos avícolas também foi avaliada em amostras congeladas colhidas no varejo em um programa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nesta avaliação, foram colhidas amostras de todas as regiões do país entre agosto de 2004 a julho de 2006 (ANVISA, 2008). Os resultados deste programa mostraram que 3,0% das amostras continham a presença de *Salmonella*. Na Tabela 9 são mostrados os resultados obtidos nas amostras de cada região.

Tabela 9. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango congeladas colhidas no varejo em cinco regiões do Brasil

Região	Carcaças de frango congeladas		
	Examinadas (nº)	Positivas (nº)	%
Norte	194	6	3,1
Nordeste	522	18	3,4
Centro-Oeste	550	10	1,8
Sudeste	838	32	3,8
Sul	524	16	3,0
Total	2.710	82	3,0

Fonte: Adaptado de ANVISA (2008).

Os resultados obtidos demonstraram que a prevalência de *Salmonella* em carcaças congeladas foi baixa e menor do que os resultados obtidos em carcaças resfriadas após o abate (MAPA, 2010). As amostras colhidas na região centro-oeste foram as que apresentaram menor positividade para a bactéria com 1,8% e as amostras da região sudeste apresentaram o maior nível de contaminação, com 3,8% (Tabela 9). Neste estudo, *S. Enteritidis* foi a mais prevalente, com 48,8% dos isolados, seguido de *S. Typhimurium* com 7,2%. Neste monitoramento também foi avaliada a quantidade de *Salmonella* em 634 das 2710 amostras de carcaças de frango colhidas. Os resultados

mostraram que entre as amostras positivas, 99,6% apresentaram contagem de *Salmonella* menor que 0,03 NMP/g (ANVISA, 2008).

A preocupação com o controle de *Salmonella* em produtos avícolas é devido ao seu impacto na saúde pública uma vez que este patógeno é uma das principais causas de enfermidades transmitidas por alimentos ao homem. Segundo informações do FDA, a *Salmonella* foi a principal causa dos recalls (51,3%) feitos nos EUA em 2012 entre diversos tipos de alimentos (FDA, 2012). Na União Europeia, a carne de aves tem sido associada com os casos de salmonelose (EFSA, 2012) e por isso, ações regulatórias têm sido adotadas para controlar a presença em produtos destinados ao consumidor (EC, 2007; EC, 2011). Em 2008, 2009 e 2010, foram registrados 134.579, 108.618 e 99.020 casos de salmonelose, respectivamente. Esta diminuição nos casos de salmonelose na União Europeia está associada com os esforços dos países membros para controlar a bactéria nas principais cadeias de produção de alimentos e, principalmente em carne avícola (EFSA, 2012).

3.1.3 IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA*

Na busca pela produção de alimentos seguros à saúde dos consumidores no que tange a identificação de produtos contaminados com *Salmonella* bem como acelerar a liberação de produtos avícolas ou etapas da produção que requerem controle da bactéria ou ainda para estudos de epidemiologia de surtos de salmonelose, a identificação da bactéria e da possível fonte de contaminação ou do tipo de *Salmonella* é de grande importância para as indústrias, governos e consumidores.

A identificação tradicional de *Salmonella* tem sido rotineiramente feita em laboratórios de indústrias e de pesquisa com base nas características bioquímicas e sorológicas do gênero *Salmonella* (ISO, 2002; DIECKMANN & MALORNY, 2011). Porém, nos últimos anos alguns países têm focado suas exigências dos produtos avícolas no controle de alguns tipos de *Salmonella* como, por exemplo, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, uma vez que estes sorotipos são os de maior impacto na saúde pública (MAPA, 2009; EC, 2011). Nestes casos, no produto no qual for detectada a presença de *Salmonella*, a bactéria deve ser isolada e identificada de alguma forma

para comprovar ou não a presença destes sorotipos. Para a indústria de alimentos o tempo necessário para esta identificação pode ser crucial, uma vez que o produto deve permanecer retido até a conclusão final da análise. Na legislação da União Europeia, a identificação de *Salmonella* em produtos avícolas *in natura* deve ser feita pela técnica padrão de sorologia, baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor (EC, 2011), o qual é conhecido como padrão internacional (GREMONT & WEILL, 2007) ou por outro procedimento validado.

Atualmente, algumas técnicas estão disponíveis para uso na identificação de *Salmonella*. Entre estas técnicas podem ser destacadas a sorologia clássica (GREMONT & WEILL, 2007), as bioquímicas automatizadas (BIOMÉRIEUX, 2010), as genéticas e, mais recentemente, a de espectrometria de massas (DIECKMANN et al., 2008; ASSIS et al., 2011; DIECKMANN & MALORNY, 2011).

A técnica tradicional de identificação sorológica baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor é amplamente aceita como padrão internacional para a diferenciação de *Salmonella* abaixo do nível de subespécies. Esta técnica é baseada em uma combinação de reações bioquímicas e sorológicas, sendo esta através de antígenos somático “O”, flagelar “H”, e capsular “Vi” (GREMONT & WEILL, 2007; DIECKMANN & MALORNY, 2011). No entanto, a técnica de sorotipagem é cara, trabalhosa, requer muito tempo para se obter o resultado e são necessários mais de 250 antissoros (DIECKMANN & MALORNY, 2011).

Um dos sistemas automatizados para a identificação bioquímica de micro-organismos, inclusive para alguns tipos de *Salmonella*, é o VITEK 2TM (BIOMÉRIEUX, 2010). Este sistema identifica o micro-organismo baseando-se nas características bioquímicas do mesmo. Para a montagem do banco de dados do sistema foram recolhidos dados de estirpes conhecidas para se estimar as reações típicas das bactérias possíveis de serem identificadas. Se o sistema não reconhecer um padrão único de identificação, ele fornece uma lista de possíveis micro-organismos, ou, o mesmo é determinado como estando fora da capacidade da base de dados do sistema. O relatório da identificação contém sugestões quanto a testes suplementares para completar a identificação, caso necessário. Ao final da identificação, um valor quantitativo da porcentagem de probabilidade é calculado de acordo com as reações bioquímicas obtidas em comparação com as reações típicas do micro-organismo

padrão do banco de dados. O intervalo de porcentagem de probabilidades, no caso de escolha única, é de 85% a 99% (BIOMÉRIEUX, 2010). Para a identificação de *Salmonella* são usados os cartões de testes para micro-organismos Gram negativos. Neste cartão há 64 diferentes testes bioquímicos que são analisados pelo sistema (PINCUS, 2012).

Outra técnica que tem sido utilizada em pesquisas para a identificação de isolados de *Salmonella* é a técnica genética, como por exemplo a de ribotipagem. Esta técnica permite obter um elevado poder discriminatório, identificando gênero e tipos de *Salmonella*, bem como o ribogruppo. Este grau de discriminação é extremamente importante em estudos epidemiológicos e também na rastreabilidade de fontes de contaminação nas indústrias de alimentos. BAILEY et al. (2002) analisaram isolados de *Salmonella* pertencentes a 32 sorotipos diferentes e encontraram 80% de correção da técnica de ribotipagem com a técnica de sorologia. O sistema de identificação de isolados de *Salmonella* pelo sistema automatizado Riboprinter® (Qualicon, Wilmington, EUA) ofereceu vantagem na rapidez e simplicidade na operação (HOLLIS, et al., 1999; BAILEY et al., 2002; FONTANA et al., 2003). MENDONÇA (2011) analisou pela técnica de ribotipagem isolados de *Salmonella* previamente identificados como sendo dos sorogrupos Minnessota, Infantis, Schwarzengrund e Newport, provenientes de dois abatedouros de frangos. Segundo a autora, a ribotipagem dos isolados de *Salmonella* permitiu fazer ligações precisas das fontes de contaminação, identificando onde um ribogruppo aparece ou desaparece, podendo desta forma identificar a etapa da cadeia de produção industrial de frango de corte que contribui para a contaminação do produto final.

Segundo BARROS DE FREITAS (2011), a ribotipagem é a técnica escolhida pelo MAPA para identificar os isolados de *Salmonella* obtidos em carcaças de frangos relacionadas com o programa de redução de *Salmonella* (MAPA, 2003). Entre 2.293 isolados de *Salmonella* ribotipados foram identificados 14 diferentes sorotipos da bactéria, sendo que *S. Enteritidis* foi a mais prevalente com 47,7%, seguida de *S. Typhimurium* com 9,03% e de *S. Agona* com 5,32%. Os demais sorotipos de *Salmonella* encontrados tiveram prevalências abaixo de 5,0%. As informações sobre os ribogruppos e suas distribuição no Brasil ainda não foram divulgadas pelo MAPA.

Nos últimos tempos, a espectrometria de massas tem sido usada para a identificação de micro-organismos, principalmente aqueles de interesse clínico devido à rapidez com que a mesma gera os resultados. A espectrometria de massas é uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou grupamentos de moléculas sendo que a mesma mede a relação entre a massa e a carga (m/z). Uma vez que esta técnica mede a relação entre a massa e a carga, um espectrometro de massas engloba uma fonte de ionização para obtenção de íons, um analisador de massa, o qual separa os íons formados, um detector destes íons e um sistema de aquisição de dados. Uma das fontes de ionização mais comuns empregada é a *matriz assisted laser desorption ionization* (MALDI) e os analisadores são quadrapolos, íons-traps, *time of flight* (TOF). A tradução que mais esclarece a sigla MALDI seria processo de ionização por desorção de laser assistida por matriz. Ao mesmo tempo tem a capacidade de absorver a energia emitida por um laser (light amplification stimulated energy radiation) e desencadear um processo de desorção o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o estado gasoso. Já a sigla TOF caracteriza o tempo de voo da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector (ASSIS et al., 2011). Em resumo, uma vez ionizada e desorvida, a amostra é acelerada por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, separada em função de sua massa molecular e sua carga e, assim, tem-se a medida de relação massa/carga.

A espectrometria de massas aplicada na identificação de micro-organismos analisa a bactéria como uma mistura de moléculas de proteína, carboidratos, lipídios, DNA, RNA, entre outros, as quais apresentam massas moleculares diferentes, ou seja, uma grande quantidade de moléculas é detectada simultaneamente. Essa mistura de moléculas gera um espectro de massa que é característico de cada bactéria. Desta forma, diferentes micro-organismos apresentam diferentes espectros de massa, independente da condição de cultivo. A partir dos espectros são formados bancos de dados específicos de cada empresa que comercializa os equipamentos de detecção e análise (BRUKER-DALTONICS, 2008; MURRAY, 2010).

A utilização da espectrometria de massas para identificar micro-organismos de interesse clínico já é uma realidade na Europa. No Brasil, o primeiro espectrofotômetro de massa com aplicação na identificação de micro-organismos foi instalado em 2010 e

esta ferramenta já está sendo utilizada por alguns grupos de pesquisa voltados para estudos clínicos (PASCON et al., 2011). No entanto, estudos com isolados de importância em alimentos ainda não tem sido realizados no Brasil, apesar do grande potencial da técnica.

3.2 CAMPYLOBACTER

3.2.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

O gênero *Campylobacter* é formado por um grupo de bactérias Gram negativas curvada em forma de S. Estas bactérias foram inicialmente reconhecidas como patógenos em animais, causando infecções e abortos em cabras. O gênero *Campylobacter* compreende 17 espécies e seis subespécies, muitas das quais são microaerófilas. A maioria dos casos de campylobacteriose é causada por duas espécies do gênero: *C. jejuni* (subespécie jejuni) e *C. coli*, mas outras espécies como *C. lari* e *C. upsaliensis* também têm sido isoladas em pacientes com diarreia, mas com menor frequência de relatos (WHO, 2012).

Campylobacter jejuni e *C. coli* são geralmente referenciadas como termófilas ou termotolerantes e crescem preferencialmente a 42 °C. Como as demais espécies do gênero, *C. jejuni* e *C. coli* são comumente encontrados na microbiota intestinal de todos os animais de sangue quente, mas o intestino das aves, com temperatura de 42 °C, parece ser o habitat preferencial da bactéria (WHO, 2012). Na vasta maioria dos casos, *Campylobacter* é encontrado em fezes de animais assintomáticos (EFSA, 2010a). Embora a bactéria não cresça fora do intestino do hospedeiro, ela tem a habilidade para sobreviver por consideráveis períodos de tempo, especialmente em condições de alta umidade, frio e fora da luz solar direta (EFSA, 2010b).

Consequentemente, *C. jejuni* e *C. coli* são ubíquos no ambiente e, portanto, há muitas fontes de contaminação pela bactéria e que podem chegar até o homem hospedeiro. *Campylobacter* pode ser transmitido a partir dessas fontes para os seres humanos por muitos caminhos diferentes (EFSA, 2010b). Podem ser transportados diretamente dos animais para os seres humanos através das mãos, água consumida

ou água de recreação e vegetais crus contaminados. As carnes também têm um importante papel na transmissão de *Campylobacter* (EFSA, 2010a). O conteúdo intestinal dos animais, muitas vezes pode contaminar as carcaças durante o abate (ARSENAULT et al., 2007; EFSA, 2010b). Isto é especialmente verdadeiro para aves, onde a natureza do processo de abate permite pontos de contaminação fecal quando comparado com o processo de abate de mamífero (EFSA, 2010b).

3.2.2 *CAMPYLOBACTER* NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE

A presença de *Campylobacter* em carne de frango geralmente é elevada, mas pode variar de acordo com cada estudo. Na literatura há relatos de prevalência de 36,9% no Canadá (ARSENAULT et al., 2007), 44,8% na Nova Zelândia (CHRYSTAL et al., 2008), 37,1% na Itália (PEPE et al., 2009) e 6,3% na Estônia (MARAMAE et al., 2010).

Segundo ROSENQUIST et al. (2006), quanto maior a concentração de *Campylobacter* no intestino dos frangos, maior será a concentração da bactéria nas carcaças, indicando que a redução de *Campylobacter* em carcaças pode ser feita pela redução da bactéria no intestino das aves vivas. Por isso, os programas de controle de *Campylobacter* em frangos devem se basear em uma abordagem integrada de toda a cadeia, desde as granjas até o abate dos animais. Em estudo realizado na União Europeia, entre seus estados membros, foi detectado que lotes de frangos infectados com *Campylobacter* tinham uma probabilidade 30 vezes maior de resultar em carcaças contaminadas com *Campylobacter* e que tais carcaças podem conter altos níveis da bactéria. Carcaças de frango contaminadas com *Campylobacter* também podem derivar de lotes não contaminados, implicando em uma possível contaminação cruzada durante o abate. O risco de contaminação de carcaças de frango com *Campylobacter* varia significativamente entre os países e entre os abatedouros e na quantidade da bactéria encontrada nas carcaças. Isso indica que alguns abatedouros são mais capazes de controlar *Campylobacter* do que outros. Outros fatores também estão relacionados com o aumento no risco de contaminação das carcaças por

Campylobacter. Em particular a idade de abate das aves, períodos de meses mais quentes e a hora do dia quando os animais são abatidos estão relacionados com um aumento na contaminação por *Campylobacter* (EFSA, 2010b).

ARSENAULT et al. (2007) avaliaram 55 diferentes fatores relacionados às etapas de criação, transporte dos animais e abate visando associá-los com a prevalência de *Campylobacter* em carcaças. Segundo os autores, a prevalência média de *Campylobacter* nas carcaças foi de 35,8% e foi observado que carcaças com alta prevalência (40,5%) de *Campylobacter* eram provenientes de lotes que continham a bactéria no ceco. Adicionalmente, a positividade de carcaças foi maior em lotes que continham mais de 20% dos animais com ração no papo e carcaças contaminadas com fezes.

Na União Europeia, durante o ano de 2009, *Campylobacter* foi encontrado em 24,1% das amostras colhidas em granjas antes do abate. Em 2010 o percentual de positividade diminuiu para 18,2% sendo que neste período *C. jejuni* foi a espécie mais prevalente, tendo sido encontrada em 30,6% das amostras positivas seguido de *C. coli* com 23%. Em carne de frango, *Campylobacter* foi encontrada em 31% e 29,6% das amostras analisadas durante os anos de 2009 e 2010, respectivamente. Assim como nos animais, em carnes, *C. jejuni* e *C. coli* também foram as espécies mais prevalentes, com 34,2 e 27,3%, respectivamente entre as amostras positivas (EFSA, 2012).

Na Suécia, o programa de controle de *Campylobacter* realizado desde 2001 na cadeia de produção de frangos apontou que os índices de prevalência da bactéria em carcaças de frango caíram de 20% em 2002 para 13% em 2005. Durante os cinco primeiros anos do estudo, o pico sazonal com maior presença de *Campylobacter* foram nos meses de verão (HANSSON et al., 2007).

KEGODE et al. (2008) detectaram *C. jejuni* e *C. coli* em 9,0% de amostras de carne de frango analisadas sendo que *C. jejuni* foi a principal espécie detectada nas amostras analisadas. Dentre as 190 amostras de carne de frango analisadas no Irã, 94 (49,5%) estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que *C. jejuni* foi mais isolado do que *C. coli* (DALLAL et al., 2010). Resultados elevados também foram detectados na Polônia, no qual 75% das carcaças de frango estavam contaminadas com espécies de *Campylobacter* (ROZYNEK et al., 2008).

Na Estônia, o nível de contaminação de *Campylobacter* em ceco de frangos entre os anos de 2005 e 2007 foi de 6,3%. Por outro lado, em carcaças de frango, entre os anos de 2002 a 2007 a prevalência foi de 12,3%. *Campylobacter jejuni* foi a espécie predominante entre as espécies isoladas (98,2%) seguida de *C. coli* (1,4%) e *C. lari* (0,4%) (MARAME et al., 2010).

Devido à alta prevalência de *Campylobacter*, muitos estudos têm focado na quantificação da bactéria em amostras de alimentos. As contagens de *Campylobacter* em amostras de carcaças de frango variaram amplamente entre os diferentes países (EFSA, 2010a). No geral, é observada uma tendência de elevadas contagens em países com alta prevalência. Na União Europeia, quase a metade (47,0%) das carcaças continham menos de 10 UFC/g de *Campylobacter* e 12,2% continham entre 10 e 99 UFC/g. Altas contagens foram detectadas como segue: entre 100 e 999 UFC/g em 19,3%, entre 1000 e 10.000 UFC/g em 15,8% e mais do que 10.000 UFC/g em 5,8% das carcaças (EFSA, 2010a).

Em um extenso estudo realizado no Reino Unido, envolvendo 51 granjas de criação de frangos foram colhidas amostras dos ambientes de criação das aves, material do ceco e de fezes. Os resultados mostraram que 41,2% das granjas estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que em 25% das granjas positivas havia uma alta prevalência da bactéria e, em 15,6% havia uma contaminação mais baixa. Entretanto, no abate, todas as amostras de ceco estavam positivas para *Campylobacter*, com média de 8 Log UFC/g (ALLEN et al., 2009).

ROSENQUIST et al. (2006) estudaram a contagem de *Campylobacter* em carcaças de frango em quatro etapas de duas diferentes plantas de abate de frango na Dinamarca (Tabela 10). Apenas na planta I foi verificado um aumento médio significativo nas contagens de *Campylobacter* na etapa de evisceração. Na etapa de resfriamento por ar (planta I) e resfriamento por água (planta II), onde ambas incluem uma etapa de lavagem das carcaças antes do resfriamento, foi constatado uma redução na carga de *Campylobacter* de 0,83 e 0,97 UFC/g Log₁₀, respectivamente. As amostras da planta II, após a embalagem, também diminuíram significativamente a contagem de *Campylobacter*. Na planta I, as concentrações de *Campylobacter* das amostras após embalagem se mantiveram inalteradas e semelhantes às obtidas após o resfriamento. Este estudo indicou que a contaminação de carcaças de frango com

Campylobacter apresenta semelhanças em processos diferentes de resfriamento de carcaças e diferenças em etapas semelhantes.

Tabela 10. Contagem de *Campylobacter* em quatro diferentes fases do abate de frango de duas diferentes plantas de processamento

Plantas	Lote	Média do número de <i>Campylobacter</i> em pele de pescoço (Log ₁₀ UFC/g)			
		Depenagem	Evisceração	Resfriamento	Embalagem
I ¹	1	2,75 ± 0,08	3,23 ± 0,11	2,54 ± 0,16	2,13 ± 0,15
I ¹	2	1,90 ± 0,13	2,40 ± 0,17	1,43 ± 0,13	1,49 ± 0,13
II ²	4	3,85 ± 0,05	3,83 ± 0,09	2,59 ± 0,12	1,10 ± 0,10
II ²	5	3,93 ± 0,05	3,93 ± 0,05	3,24 ± 0,06	1,96 ± 0,14

¹ Resfriamento por ar; ² Resfriamento por água.

Fonte: ROSENQUIST et al. (2006).

BERRANG et al. (2009) avaliaram a presença de *Campylobacter* em 20 plantas de frango nos EUA e detectaram que as amostras de carcaças antes do processo de resfriamento tiveram uma média de 2,66 UFC/mL de *Campylobacter* sendo que o número variou de 0,78 a 4,49 UFC/mL. Após o resfriamento, a média de *Campylobacter* foi de 0,43 UFC/mL com mínimo e máximo de 0 e 1,19 UFC/mL, respectivamente.

No Brasil, a presença de *Campylobacter* também tem sido estudada em amostras avícolas. *Campylobacter jejuni* foi detectado em 4,9% das amostras colhidas durante diferentes etapas de abate de frangos no estado de São Paulo. A bactéria foi encontrada em 22,2% das amostras de fezes analisadas, em 5,6% das amostras de pena, em 5,6% das carcaças após evisceração e em 2,8% das amostras após a escaldagem e em 2,85% das amostras de água de evisceração (CORTEZ et al., 2006).

REITER et al. (2005) avaliaram a incidência e disseminação de *Campylobacter* em um abatedouro de frangos de Santa Catarina e constataram que a média geral de positividade foi de 16,6% entre as diferentes etapas avaliadas. As maiores contaminações foram observadas nas amostras de carcaça antes da evisceração com 33,3% de positividade e na bile e no intestino com 46,7% e 63,3% de positividade, respectivamente. KUANA et al. (2007) correlacionaram 11 variáveis com a presença de *Campylobacter* em lotes de frangos. Entre os principais fatores avaliados estavam os tipos de equipamentos de administração da ração e da água, reuso da cama,

presença ou não de cloro na água, calçados exclusivos para uso nas granjas e presença de gatos, cães, caprinos e suínos na mesma propriedade de criação das aves. Os resultados mostraram que 81,8% dos lotes de frango avaliados estavam contaminados com *Campylobacter*, mas nenhuma correlação da presença da bactéria foi associada com os fatores estudados.

No Brasil, não há restrição oficial quanto aos níveis de contaminação por *Campylobacter* em produtos avícolas. Na União Europeia também não há regulamentação microbiológica para *Campylobacter* em carne de frango, mas os estados membros cumprem um programa de monitoramento de sua prevalência em carnes de aves resfriadas e em ambientes de criação dos animais, bem como, o controle de casos da campylobacteriose (EFSA, 2012). Os países membros da União Europeia detectaram entre 01/01/12 e 30/11/12 cinco violações em produtos de aves resfriados com presença de *Campylobacter* o que representa 8,8% dos problemas microbiológicos encontrados em carnes de aves (RASFF, 2012). Em 2011, os EUA incluíram *Campylobacter* no programa de redução de patógenos em carcaças de frango. Neste programa, é estabelecido que não possa haver mais do que oito carcaças positivas para *Campylobacter* em 51 carcaças analisadas para cada ciclo de amostragem (FSIS, 2011).

A importância do controle de *Campylobacter* em carne de aves é devido a sua alta relação com os surtos de campylobacteriose. Na União Europeia os casos de enfermidades ocasionadas por *Campylobacter* têm aumentado nos últimos anos. Em 2008 foram 190.576 casos, em 2009, 198.682 e em 2010, 212.064 sendo que estes estão relacionados principalmente com produtos avícolas (EFSA, 2012).

3.3 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE EM CARNE DE FRANGO

Segundo BUCHANAN & ONI (2012), em microbiologia um indicador é um micro-organismo, um grupo de micro-organismos ou o produto de um metabolismo que prediz a presença da contaminação com patógenos específicos, como por exemplo, o nível de coliformes é diretamente relacionado com a presença de *Salmonella* em um produto.

No entanto, esse tipo de correlação envolve complexas medidas estatísticas sobre a população que está sendo estudada bem como sua distribuição nos alimentos. Em indústrias de alimentos, um indicador de qualidade e higiene pode ser usado para indicar que em quantidades acima de certos limites houve processamento inadequado para assegurar que patógenos podem não estar presentes (SAINI et al., 2011).

Em produtos avícolas vários indicadores são usados na legislação nacional e internacional para avaliar as condições do processo ou do produto final (MAPA, 2007; CE, 2007; FSIS, 2011). Na Tabela 11 são mostrados os principais micro-organismos indicadores de qualidade e higiene e sua aplicação em alimentos.

Tabela 11. Principais micro-organismos indicadores usados para avaliação da qualidade dos alimentos

Micro-organismos	Aplicação
Aeróbios mesófilos	Usado para avaliar a sanitização em geral, eficiência de intervenções em alguma etapa do processamento, avaliar a deterioração em alimentos cozidos prontos para o consumo, pasteurização e de especiarias
Coliformes	Usado para avaliar a contaminação fecal e sanitização em geral em matrizes como carne moída, água e especiarias
<i>Enterobacteriaceae</i>	Usado como indicador de contaminação fecal, eficiência dos programas de saneamento, em especial em alimentos com baixa aW, fórmulas infantis e produtos prontos para o consumo
<i>E. coli</i>	Usado como indicador de contaminação fecal, e avaliação da eficiência de programas de saneamento de alimentos como frutos do mar, águas e alimentos prontos para o consumo. Pode ser considerado um bom indicador de zoonoses como <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i>

Fonte: Adaptado de GHAFIR et al. (2008); BUCHANAN & ONI (2012)

Um indicador de qualidade ou higiene microbiológica pode ser utilizado para sinalizar um problema que pode repercutir na qualidade e segurança de produtos, bem como ser usado como um indicador de um problema potencial de higiene durante a produção de alimentos (JAYCUS & MCCLURE, 200--?).

Em frangos, os micro-organismos presentes e aderidos às vísceras, penas e pele das aves mais a contaminação ocasionada pelo processo, equipamentos, ambiente de abate, manipulação e contato carcaça com carcaça durante o abate podem ser encontrados nas carcaças e na carne de frango. Geralmente, os micro-organismos presentes nas carcaças e nas carnes de aves estão relacionados com a contaminação fecal (CASON et al., 2004; CASON et al., 2007; FRANCHIN et al., 2007).

3.4 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A fim de melhorar a qualidade microbiológica e a segurança da carne de aves, as indústrias implantaram e mantêm programas baseados nos princípios do sistema de APPCC (FSIS, 1998; EC, 2004; MAPA, 2006; CFIA, 2010). Por esta razão, os testes microbiológicos de carcaças de frango feitos em uma base regular podem demonstrar se os processos estão operando sob condições controladas e se medidas preventivas e corretivas precisam ser adotadas (MEAD et al., 2010). Além disso, testes microbiológicos em carcaças de frango são exigidos por órgãos regulamentadores para determinar a conformidade do processo com critérios de desempenho estabelecidos (MAPA, 2003; EC, 2007; FSIS, 2011).

Vários países têm adotado programas de redução de *Salmonella* com base em análise de carcaças de frangos, entre eles o Brasil (MAPA, 2003), os EUA (FSIS, 2012) e a União Europeia (EC, 2007). No entanto, diferentes procedimentos para o preparo das carcaças de aves para análise de *Salmonella* são utilizados nos respectivos programas oficiais. No Brasil, uma porção de 25 gramas de pele e músculo retirado das asas, partes do pescoço e pericloal da carcaça devem ser utilizadas (MAPA, 2003). Na União Europeia, uma porção de 25 g da pele do pescoço é utilizada para

análise da bactéria (EC, 2007) enquanto que nos EUA, toda a carcaça é enxaguada com 400 mL de meio de cultura (FISIS, 2011).

Inúmeros trabalhos têm sido feitos para avaliar o melhor procedimento para analisar microbiologicamente carcaças de frango (GILL et al., 2005; COX et al., 2011; COSSI et al., 2011; COSSI et al., 2012) e diferentes resultados têm sido obtidos.

Segundo GILL et al. (2008), a análise por excisão de porções de tecidos da carcaça ou a enxaguadura das mesmas, geralmente geram resultados microbiológicos similares. No entanto, variações nos resultados obtidos entre os procedimentos de preparo das carcaças de frango podem estar relacionados com as características dos procedimentos. Os procedimentos de excisão de partes da carcaça, como os adotados pelo Brasil e União Europeia, removem todas as bactérias presentes na porção do tecido, inclusive aquelas aderidas firmemente (ISO, 2003; CAPITA et al., 2004). Por outro lado, isso não acontece com o procedimento de enxágue adotado pelos EUA. O procedimento de enxágue recupera apenas as bactérias aderidas fracamente na carcaça e que estão nas superfícies externas (CAPITA et al., 2004). Outro fator importante é com relação à homogeneização das porções retiradas. Os procedimentos de excisão do tecido são subsequentemente homogeneizados em equipamentos mecânicos (ISO, 2003). Por outro lado o procedimento de enxágue abrange as partes interna e externa da carcaça, mas a homogeneização com o diluente é manual. Segundo COSSI et al. (2012), a homogeneização é um fator crítico que pode comprometer o isolamento dos micro-organismos presentes na carcaça de frango.

COSSI et al. (2011) avaliaram quatro procedimentos de preparo de carcaças (enxague, suabe da pele, excisão de músculo e excisão da pele) e observaram que, de um total de 60 amostras, a presença de *Salmonella* foi detectada em duas das amostras analisadas pelo procedimento de enxague, duas pela excisão de músculo e duas pela excisão da pele. Segundo os autores, não houve diferença entre os resultados, mas isso pode ter sido decorrente da baixa prevalência de *Salmonella* nas amostras analisadas.

COX et al. (2011) compararam os procedimentos dos EUA e da União Europeia de preparo de carcaças de frango para análise de *Salmonella* e não encontraram diferenças significativas entre eles. Os autores observaram que em carcaças colhidas após o resfriamento em água a bactéria foi encontrada em 2,8 e 6,8% usando os

procedimentos dos EUA e da União Europeia respectivamente. A combinação de amostras positivas encontradas foi de 9,6% apesar de resultados falsos negativos terem sido obtidos com ambos os procedimentos.

A obtenção de resultados falso negativos de *Salmonella* por diferentes procedimentos de preparo das carcaças de frango podem estar relacionados com alguns fatores. A distribuição das células bacteriana nas carcaças de frango não é homogênea (SMITH, 2010) e muitas delas podem estar firmemente aderidas ou aprisionadas na pele e nos músculos da carcaça e podem ser de difícil remoção durante o preparo das amostras (CAPITA et al., 2004; MEAD et al., 2010).

A quantidade da unidade analítica usada nos diferentes procedimentos também é variável. Usando os procedimentos do Brasil e da União Europeia são removidos 25 g do peso total das carcaças, que para uma carcaça de 2 Kg representa 1,25%, do peso da carcaça enquanto que para o procedimento de enxágue, adotado pelos EUA, é usado 7,5% do volume total do líquido de enxágue das carcaças para efetuar o pré-enriquecimento. Geralmente, quando presente nas carcaças, há poucas células de *Salmonella* (SIMMONS et al., 2003; ANVISA, 2008). KING et al. (2008) analisaram carcaças de frango com incubação de diferentes volumes do líquido de enxágue e constataram que com incubação de 30 mL, *Salmonella* foi detectada em 20% das amostras analisadas. Quando 50 mL foram incubados, foi encontrado 37,8% de amostras positivas e com 400 mL de líquido de enxágue incubado foi detectado 47,8% de positividade.

Segundo MEAD et al. (2010), as estratégias de amostragem de carcaças de frango para análise de *Salmonella* deveriam ser definidas de acordo com os riscos envolvidos na saúde pública, com a prevalência para o micro-organismo alvo, com o nível de confiança para os resultados obtidos e pelos princípios gerais de estatística. Entretanto, para países exportadores de carne de frango como o Brasil, deve ser levado em consideração os requisitos dos países importadores. Segundo o acordo de aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias da OMC em seu artigo 4º os países membros aceitarão as medidas de outros países membros como equivalentes para situações de exportação, mesmo se tais medidas diferem de suas próprias medidas (MIRANDA et al., 2004). No entanto, a demonstração de equivalência pode ser difícil quando há diferenças consideráveis nos testes regulatórios requeridos em diferentes

partes do mundo. CASON et al. (2010) avaliaram a probabilidade estatística de aprovação de ciclos de amostragem considerando as diferenças de preparo das carcaças de frango adotados nos EUA e pela União Europeia. Os autores concluíram, com base no histórico de prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango e produtos de frango destes países, que a taxa de aprovação dos ciclos, seria de 79,3% usando o procedimento dos EUA e de 79,5% usando a amostragem e procedimento da União Europeia, mesmo com as diferenças de cada um dos planos de amostragem.

Além de *Salmonella*, os diferentes procedimentos de preparo das amostras de carcaças também podem afetar os resultados das quantificações de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene. Estas avaliações são importantes para validar as condições de operação das diferentes etapas do processo de abate. De um modo geral, as bactérias entram no abatedouro aderidas às partes externa dos animais, mas também são incorporadas ao longo do processo (CASON et al., 2004; CASON et al., 2007; FRANCHIN et al., 2007). A adesão das bactérias aos tecidos dos animais que resultam nas carcaças podem ser de difícil remoção (CAPITA, et al., 2004). Desta forma, os procedimentos de preparo das carcaças de frango para análises microbiológicas devem ser capazes de remover estes micro-organismos a fim de serem adequadamente quantificáveis.

Os principais micro-organismos ou grupos de micro-organismos avaliados em carcaças de frango são *E. coli*, coliformes totais, aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae*. Nas avaliações microbiológicas, as contagens de aeróbios mesófilos são frequentemente usadas como indicador de qualidade e *Enterobacteriaceae*, coliformes e *E. coli* são usadas para avaliar a presença de contaminação entérica e as condições de higiene do processo. (GHAFIR et al., 2008).

Os níveis de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene em carcaças de frango são variáveis. SOUZA et al. (2012) quantificaram os principais micro-organismos indicadores de qualidade e higiene em carcaças de frango utilizando o procedimento para a pesquisa de *Salmonella* preconizado pelo Brasil (MAPA, 2003). Segundo os autores, as contagens de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes e *E. coli* antes do resfriamento foram de 6,17: 4,61: 3,88 e 3,30 Log₁₀ de UFC/g, respectivamente. Após o resfriamento, a média das contagens foram menores, sendo que a média de aeróbios mesófilos foi de 4,83 Log₁₀ de UFC/g, de

Enterobacteriaceae 3,25 Log₁₀ de UFC/g, de coliformes de 2,83 Log₁₀ de UFC/g e de *E. coli* de 1,96 Log₁₀ de UFC/g.

COSSI et al. (2011) avaliaram quatro procedimentos de preparo de carcaças (enxague, suabe da pele, excisão de músculo e excisão da pele) e observaram que *E. coli* foi detectada em 48 amostras, sendo que apenas o procedimento de suabe da pele foi menos eficiente para detectar a presença da bactéria e diferiu estatisticamente dos demais procedimentos. Com relação às análises de *E. coli*, coliformes, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos, COSSI et al. (2012) observaram que quando os procedimentos por excisão de partes da carcaça foram usados, os mesmos foram capazes de recuperar as maiores quantidades de bactérias em comparação com as técnicas de suabe e de enxágue. No entanto, segundo os autores, a excisão do tecido foi estatisticamente melhor aos outros procedimentos para as contagens de *E. coli* e coliformes, mas não para as análises de *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos.

SMITH (2010) observou que os níveis de bactérias obtidos das regiões frontal e dorsal de uma mesma carcaças de frango podem variar. Os autores encontraram na região dorsal 3,4 Log UFC/mL e na região frontal 2,9 Log UFC/mL de *E. coli*. Para coliformes, as contagens na região dorsal da carcaça foram de 3,7 Log UFC/mL e na região frontal de 3,2 Log UFC/mL. Ao comparar o procedimento de enxágue e de excisão de 25 g para análise de *E. coli* e coliformes em peito e coxa de frango, diferenças significativas nas contagens obtidas para os dois grupos de micro-organismos foram encontradas entre os dois procedimentos comparados, sendo que as maiores contagens foram obtidas pelo procedimento de enxágue.

GHAFIR et al. (2008) constataram que o procedimento de enxágue é superior ao procedimento de excisão de 25 g de pele de pescoço para determinar contagens de micro-organismos indicadores em carcaças de frango. De acordo com GILL & JONES (2000), a excisão de partes da carcaça seguida de homogeneização mecânica é o procedimento mais efetivo para a contagem de bactérias porque este procedimento produz resultados mais reais e com menos variação nas contagens de bactérias.

De acordo com o preconizado pela legislação Europeia, a amostragem da pele de pescoço é feita sem remover ou destruir as carcaças (HUTCHISON et al., 2006). O procedimento de preparo das amostras usado pelos EUA também pode ser feita no abatedouro, sem a necessidade de transportar a carcaça até o laboratório. Por outro

lado, a análise removendo 25 g de partes da carcaça, conforme procedimento do Brasil (MAPA, 2003), a carcaça precisa ser transportada para o laboratório, pois requer a adoção de procedimentos laboratoriais mais complexos.

PARTE EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos deste trabalho, o conteúdo foi dividido em capítulos os quais serão apresentados a seguir:

- I. Comparação de três procedimentos de preparo de carcaças de frango para análises microbiológicas;
- II. Mapeamento dos micro-organismos patogênicos e indicadores de qualidade e higiene nas principais etapas do abate de frangos;
- III. Contaminação fecal em carcaças de frango: implicações microbiológicas e procedimentos para a sua remoção;
- IV. Comparação de quatro técnicas para identificação de diferentes tipos de *Salmonella*.

CAPÍTULO I - COMPARAÇÃO DE TRÊS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE CARÇAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi comparar três diferentes procedimentos de preparo de carcaças de frango para análises microbiológicas. Os objetivos específicos foram: (i) comparar os procedimentos oficiais do Brasil, da União Europeia e dos EUA para o preparo de carcaças de frango para análises de *Salmonella* em amostras diferentes e em uma mesma carcaça; (ii) comparar os mesmos procedimentos de preparo de carcaças de frango para determinar a contagem de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Abatedouro

As carcaças foram obtidas de um abatedouro comercial localizado na região oeste do estado de Santa Catarina que processava frangos com aproximadamente seis (6) semanas de idade sob condições industriais típicas de abate (Figura 3). O abatedouro operava com Serviço de Inspeção Federal, com sistema de APPCC implantado, conforme requisitos do MAPA (MAPA, 2006) e controle de *Salmonella* em carcaças de frangos, de acordo com os requisitos oficiais (MAPA, 2003).

2.1.2 Coleta das carcaças

Carcaças de frangos de diferentes lotes foram escolhidas aleatoriamente entre maio e junho de 2010. Um lote foi definido como um grupo de animais mantidos em uma mesma granja durante o mesmo período de tempo e abatidos no mesmo dia e de forma ininterrupta após o início. Durante este período carcaças de frangos de 80 lotes diferentes foram colhidas. De cada lote selecionado, quatro carcaças foram colhidas diretamente da linha de produção, após a saída das mesmas do sistema de resfriamento em chiller com água (80 lotes x 4 carcaças = 320 amostras). A coleta das carcaças foi feita em condições assépticas e as mesmas foram acondicionadas em embalagens estéreis e identificadas. Adotou-se como procedimento sempre identificar a primeira carcaça colhida com a letra A, a segunda com a letra B, a terceira com a letra C e a quarta com a letra D. As amostras eram então transportadas para o laboratório para pesquisa de *Salmonella* (n = 480) e para a contagem de *E. coli* (n = 480), coliformes totais (n = 480), *Enterobacteriaceae* (n = 480), e aeróbios mesófilos (n = 480). As análises foram feitas no laboratório da indústria onde as amostras foram colhidas sendo as mesmas analisadas no mesmo dia da coleta.

2.1.3 Preparo das carcaças para análise

No laboratório, a parte externa de cada embalagem contendo as carcaças foi sanitizada com álcool 70%. O líquido foi friccionado à embalagem com auxílio de algodão estéril para sanitizar e remover eventuais sujidades aderidas à embalagem. Em seguida, em uma capela de fluxo laminar, cada uma das amostras coletadas (carcaças A, B, C e D) foi preparada como segue:

- a) Carcaça A [procedimento oficial do Brasil, (MAPA, 2003)]: 25 g (50% de pele e 50% de músculo) das asas, pele de pescoço e abertura abdominal foram removidas da carcaça com auxílio de bisturi e pinça estéreis e transferidos para uma embalagem plástica específica para análise microbiológica. À amostra foram adicionados 225 mL de água peptonada e tamponada (APT) a 1%. A amostra foi submetida à homogeneização em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil) durante 60 s.
- b) Carcaça B [procedimento oficial da União Europeia (EC, 2007)]: 25 g de pele de pescoço foram removidos da carcaça com auxílio de bisturi e pinça estéreis e transferidos para uma embalagem plástica específica para análise microbiológica. Um volume de 225 mL de APT 1,0% estéril foi adicionado à amostra. A amostra foi submetida à

homogeneização em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil) durante 60 s.

c) Carcaça C [procedimento oficial dos EUA (FSIS, 2011)]: foram adicionados 400 mL de APT 0,1% dentro da embalagem plástica contendo a carcaça. O líquido de APT 0,1% foi usado para enxaguar a carcaça durante 60 seg, por meio de fricções manuais nas suas superfícies interna e externa. Posteriormente, a carcaça foi removida da embalagem e o líquido remanescente foi submetido à homogeneização em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil) durante 60 s. O líquido obtido foi usado para a execução das análises. Para análise de *Salmonella*, 30 mL do caldo de enxágue da carcaça foi incorporado a 30 mL de APT preparada em concentração dupla. Esta amostra foi então agitada vigorosamente de forma manual e submetida à análise.

d) Carcaça D: esta carcaça foi utilizada para retirar as unidades analíticas e realizar os três procedimentos de preparo, conforme descrito anteriormente nos itens a, b e c. O preparo das amostras iniciou-se pelo procedimento oficial adotado pelo Brasil, seguido do procedimento da União Europeia e posteriormente pelo procedimento dos EUA. Para o preparo da amostra, segundo o procedimento da União Europeia, pele das regiões adjacentes ao pescoço foi usada quando não havia pele de pescoço suficiente para compor as 25 g.

Alíquotas de cada uma das amostras preparadas foram tomadas para pesquisa de *Salmonella* e contagens de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos.

2.2 MÉTODOS

Deve-se ressaltar que para reduzir a variabilidade nos resultados os procedimentos de preparo das carcaças de frango foram padronizados, bem como os métodos de análises, usando os procedimentos de qualidade do laboratório, os quais eram baseados na ISO 17025 (ABNT, 2005). Para isso, todas as amostras preparadas foram pré-enriquecidas durante o mesmo período de tempo para a análise de *Salmonella*. As temperaturas de incubação dos caldos de enriquecimento seletivo e dos meios sólidos de isolamento, assim como os testes e reagentes de identificação bioquímica, foram mantidos nas

mesmas condições para todas as amostras analisadas e todos os isolados testados. Os meios de cultura utilizados em cada dia em que os testes foram conduzidos eram provenientes do mesmo lote de produção e de um mesmo fabricante. Todos os equipamentos e pipetadores usados nas análises estavam devidamente calibrados.

2.2.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

As amostras preparadas no item 2.1.3 foram submetidas às seguintes etapas de análise:

Pré-Enriquecimento das amostras: incubação das amostras a 36 ± 1 °C por 21 ± 3 h em incubadora (Fanen 347 CD, São Paulo, SP, Brasil).

Extração do DNA: após o pré-enriquecimento, foi feita a lise celular para a extração do DNA (ácido desoxirribonucleico). A solução tampão de lise e protease, foi preparada pela adição de 150 µL de protease e 12 mL de solução tampão, ambos fornecidos prontos pela Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA). Foram adicionados aos tubos de lise, 200 µL da solução tampão de lise e protease e 10 µL da amostra pré-enriquecida. Os tubos foram levados para blocos de aquecimento a 37 ± 2 °C durante 20 min e, posteriormente, a 95 ± 3 °C por 10 min. Após as duas etapas de aquecimento, as amostras foram transferidas para o bloco de refrigeração e mantidas em geladeira por, no máximo, 48 h. As amostras foram retiradas da geladeira 5 min antes de iniciar a etapa subsequente.

Preparo da amostra e reação nos tubos de PCR: foram adicionados aos tubos de PCR BAX® System *Salmonella*, 50 µL da solução de lise contendo o DNA extraído. Os tubos de PCR foram levados para o termociclador/detector do equipamento BAX® System Q7 Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA), previamente preparado para a análise de *Salmonella*. O tempo de detecção e leitura, geralmente 3 h e 30 min, foi controlado e indicado pelo Sistema BAX® System Q7.

No final da etapa de reação, o resultado de cada amostra analisada foi mostrado como positivo ou negativo, diretamente na tela do computador através do programa do equipamento BAX® System Q7. O resultado obtido como negativo no equipamento BAX® System Q7 foi considerado como negativo definitivo e o resultado obtido como positivo foi considerado positivo presuntivo.

Os resultados presuntivos positivos foram confirmados pelo método bacteriológico segundo a ISO 6579 (ISO, 2002). Alíquotas de 0,1 mL de cada amostra pré-enriquecida,

mantida em geladeira entre 5 ± 3 °C após o período de incubação, foram transferidas para tubo de ensaio contendo 9,9 mL de meio Rappaport Vassiliadis (Merck, Darmstad, Alemanha) e 1 mL para tubo contendo 9 mL de caldo tetracionato-verde brilhante (Merck, Darmstad, Alemanha). Os tubos de meio de Rappaport Vassiliadis foram incubados a $41,5 \pm 1$ °C em banho maria (Fanen, São Paulo, SP, Brasil) e de tetracionato-verde brilhante a 36 ± 1 °C em incubadora Fanen 347 CD, São Paulo, SP, Brasil, ambos por 21 ± 3 h. Após a incubação, cada amostra enriquecida em Rappaport Vassiliadis e em tetracionato-verde brilhante foi estriada em placa contendo ágar verde brilhante (Merck, Darmstad, Alemanha) e em placa contendo ágar XLT4 (Merck, Darmstad, Alemanha). Todas as placas foram incubadas por 21 ± 3 h a 36 ± 1 °C e examinadas quanto à presença ou não de colônias suspeitas de *Salmonella*. As colônias suspeitas de *Salmonella* foram identificadas bioquímica e sorologicamente. Testes bioquímicos incluíram a avaliação da produção de urease, fermentação da glucose, sacarose e lactose em ágar três açúcares e ferro - TSI (Merck, Darmstad, Alemanha), descarboxilação da lisina, produção de H₂S, motilidade e produção de indol. O teste sorológico foi realizado com soro polivalente O (Probac, Brazil). Os isolados de *Salmonella* foram enviados para identificação sorológica no laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro.

2.2.2 Contagem de *E. coli* e coliformes totais

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6414, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 ± 2 h e, posteriormente, foram submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Nestas placas, as colônias de *E. coli* foram caracterizadas por apresentarem coloração azul com bolhas de gás e as colônias de coliformes totais por colônias vermelhas com a presença de gás. As contagens de *E. coli* e coliformes totais foram determinadas conforme procedimento do USDA (USDA, 1998).

2.2.3 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-2} a 10^{-5} foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6421, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C

por 24 ± 2 h e, posteriormente, foram submetidas a contagem das UFC, conforme orientação do fabricante. Foram contadas como colônias de *Enterobacteriaceae* aquelas que apresentavam coloração vermelha associadas apenas com formação de gás; colônias vermelhas associadas apenas com zonas ácidas de coloração amarela e colônias vermelhas associadas com formação de gás e com zonas ácidas de coloração amarela, conforme orientação do fabricante. As contagens de *Enterobacteriaceae* foram determinadas conforme AOAC (2003).

2.2.4 Contagem de aeróbios mesófilos

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-3} a 10^{-5} foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6400, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 48 ± 4 h e, posteriormente, submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Foram contadas como colônias de aeróbios mesófilos as que apresentavam coloração vermelha, conforme orientação do fabricante. As contagens de aeróbios mesófilos foram determinadas conforme procedimento do USDA (USDA, 1998).

2.2.5 Cálculo dos resultados das contagens de micro-organismos

Quando o procedimento dos EUA foi usado, as UFC/g foram calculadas usando a fórmula $\text{UFC/g} = (\text{UFC} \times V \times D) / P$, sendo UFC = unidades formadoras de colônias obtidas na placa, V = volume de APT usada para lavar a carcaça (400 mL), D = diluição usada na placa e P = peso da carcaça.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação geral dos resultados de *Salmonella* pelos diferentes procedimentos foi usado o teste exato de Fisher ($p \leq 0,05\%$). Resultados coincidentes e divergentes entre os procedimentos foram comparados pelo teste de McNemar ($p \leq 0.05$). Para a avaliação das contagens de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos os resultados em UFC/g foram transformados em Log_{10} UFC/g e submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os coeficientes de variação dos resultados das análises obtidos com cada

um dos diferentes procedimentos de preparo das carcaças foram calculados em porcentagem, dividindo o desvio padrão pela média das contagens obtida com cada um dos procedimentos e multiplicado por 100. Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5 % de probabilidade foram usados para comparar os coeficientes de variação obtidos. Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa estatístico XLSTAT versão 2009.5.01Addinsoft™ New York, USA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS OFICIAIS DO BRASIL, UNIÃO EUROPEIA E EUA DE PREPARO DE CARCAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISE DE *SALMONELLA*

Os procedimentos oficiais de preparo de carcaças de frango para a análise de *Salmonella* durante o processo de abate usados no Brasil, na União Europeia e nos EUA foram comparados e os resultados estão apresentados na Tabela I.1.

Usando diferentes carcaças, foram detectados 7,5; 12,5 e 5,0 % de positividade de *Salmonella* pelos procedimentos do Brasil, da União Europeia e dos EUA, respectivamente. Quando uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos de preparo das amostras, a presença de *Salmonella* foi maior. Usando o procedimento do Brasil, *Salmonella* foi detectada em 10% das amostras testadas, com o procedimento da União Europeia foi detectado 15% de positividade e com o procedimento dos EUA o percentual de positividade foi de 11,3% (Tabela I.1). Baseado na análise estatística, não foi encontrada diferença entre os resultados de *Salmonella* obtidos pelos três procedimentos de preparo de carcaças de frango (Teste exato de Fisher $p \geq 0,05\%$). Isso aconteceu quando diferentes ou uma mesma carcaça foram usadas para comparar os procedimentos.

Não foram encontrados na literatura científica estudos comparativos de preparo de carcaças de frango usando o procedimento do Brasil com outros procedimentos. Por outro lado, COX et al. (2011) compararam, recentemente, os procedimentos dos EUA com o da União Europeia de preparo de carcaças de frango para análise de *Salmonella* e não

encontraram diferenças significativas entre os dois procedimentos avaliados. Os autores observaram que em carcaças colhidas após o chiller de resfriamento à água, a bactéria foi encontrada em 2,8 e 6,8% usando os procedimentos dos EUA e da União Europeia, respectivamente. A combinação de amostras positivas ao utilizar os dois procedimentos foi de 9,6%.

Tabela I.1. Detecção de *Salmonella* em carcaças de frango usando os procedimentos de preparo das amostras do Brasil, da União Europeia e dos EUA em amostras diferentes e em uma mesma carcaça

Procedimentos de preparo ^a	No. amostras positivas / total de análises (%)	
	Diferentes carcaças ¹	Mesma carcaça ²
Brasil	6/80 (7,5)	8/80 (10,0)
UE	10/80 (12,5)	12/80 (15,0)
EUA	4/80 (5,0)	9/80 (11,3)

^a Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloacal; UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço; EUA (Estados Unidos da America) - enxaguadura da carcaça

¹ Diferentes carcaças foram usadas para comparar cada um dos procedimentos, ² Uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos.

Resultados do no. de amostras positivas obtidas com os três diferentes procedimentos em diferentes carcaças ou em uma mesma carcaça não são estatisticamente diferentes pelo teste exato de Fisher ($\alpha \leq 0,05\%$).

Na Tabela I.2 é apresentado a comparação dos resultados coincidentes e divergentes usando os procedimentos de preparo das amostras do Brasil, da União Europeia e dos EUA em amostras diferentes e em uma mesma carcaça. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os pares de procedimentos comparados ($p \geq 0,05$) pelo teste de McNemar. COSSI et al., (2011) compararam quatro procedimentos de preparo de carcaças de frango (enxágue, suabe da pele, excisão de músculo e excisão da pele) e observaram que, de um total de 60 amostras analisadas, *Salmonella* foi detectada em duas amostras pelo procedimento de enxágue (EUA), duas pela excisão de músculo e duas pela excisão da pele. Não foi encontrada diferença significativa quando os procedimentos foram comparados em pares e, segundo os autores, não foi possível avaliar a diferença entre os procedimentos devido à baixa prevalência de *Salmonella* nas amostras analisadas. Ainda, neste estudo, a excisão do tecido e da pele não foi executada da mesma forma como preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2003) o que também dificulta qualquer outra comparação entre os procedimentos.

Dos 80 lotes de carcaças coletadas para análise de *Salmonella*, 19 (23,75%) deles continha a presença da bactéria. Resultados positivos de *Salmonella* usando diferentes carcaças ou uma mesma carcaça para comparar os três procedimentos de preparo das amostras foram observados aleatoriamente. A Tabela I.3 mostra a combinação de resultados positivos de *Salmonella* obtidos com os três procedimentos em diferentes amostras e em uma mesma carcaça e os sorotipos identificados nas amostras positivas. Os resultados mostram que em apenas uma situação (Tabela I.3, linha 7) *Salmonella* foi detectada por todos os procedimentos testados e em todas as carcaças de um mesmo lote.

Tabela I.2. Comparação dos resultados coincidentes e divergentes usando os procedimentos de preparo das amostras dos no Brasil, União Europeia e EUA em amostras diferentes e em uma mesma carcaça

amostras diferentes e em uma mesma carcaça					pb
Comparação dos procedimentos de preparo em pares ^a :	Coincidentes		Divergentes		
	Positivo	Negativo	Positivo; negativo	Negativo; positive	
<i>Diferentes carcaças¹:</i>					
Brasil; UE	5	69	1	5	0,220
Brasil; EUA	2	72	4	2	0,683
UE; EUA	2	68	8	2	0,113
<i>Mesma carcaça²:</i>					
Brasil; UE	7	67	1	5	0,220
Brasil; EUA	4	67	4	5	1,000
UE; EUA	5	64	7	4	0,546

^a Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloacal; UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço; EUA (Estados Unidos da America) - enxaguadura da carcaça

¹ Diferentes carcaças foram usadas para comparar cada um dos procedimentos, ² Uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos.

^b Valores de $p \leq 0.05$ entre os pares de métodos de preparo das carcaças comparados são significativamente diferentes pelo teste de McNemar.

De um modo geral, quando *Salmonella* foi detectada por mais de um dos procedimentos de preparo das amostras o mesmo sorotipo da bactéria foi encontrado nas amostras, com prevalência de *S. Enteritidis*. Sorotipos de *S. Saintpaul* e *S. Muenchen* também foram encontrados nas amostras testadas. Em uma das amostras (Tabela I.3, linha 14), quando uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos, foi obtido positividade de *Salmonella* apenas pelos procedimentos do Brasil e da União Europeia, mas não pelo procedimento dos EUA. Neste caso os isolados identificados foram diferentes, tendo sido encontrado *S. Enteritidis* pelo procedimento do Brasil e *S.*

Tabela I.3. Combinação de resultados de *Salmonella* em carcaças de frango usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça e sorotipos encontrados.

Lotes Positivos	Procedimentos e ocorrência de <i>Salmonella</i> (Sorotipo) utilizando					
	Diferentes carcaças ¹			Mesma carcaça ²		
	Brasil ^a	UE ^b	EUA ^c	Brasil ^a	UE ^b	EUA ^c
1	A	P (NS)	A	A	P (NS)	P (NS)
2	A	P (NS)	A	A	P (NS)	A
3	A	A	P (NS)	A	A	P (NS)
4	A	P (Enteritidis)	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A
5	A	P (Enteritidis)	A	A	A	A
6	A	P (Enteritidis)	A	A	A	A
7	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)
8	A	A	A	A	P (Enteritidis)	A
9	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)
10	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)
11	P (Enteritidis)	A	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)
12	P (Saintpaul)	P (Saintpaul)	A	A	A	A
13	A	A	A	A	A	P (Enteritidis)
14	A	A	A	P (Enteritidis)	P (Muenchen)	A
15	A	A	A	P (Enteritidis)	A	P (Enteritidis)
16	A	A	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A
17	A	A	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A
18	A	A	A	A	P (Enteritidis)	A
19	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	P (Enteritidis)	A	A	P (Enteritidis)
Total Positivos	6	10	4	8	12	9

^a Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloal; ^b UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço, EUA (Estados Unidos da America) - enxaguadura da carcaça.

A – Ausência, P – Presença, NS – Não sorotipado.

¹ Diferentes carcaças de um mesmo lote foram usadas para comparar os três diferentes procedimentos; ² Uma mesma carcaça foi usada para realizar os três diferentes procedimentos.

Muenchen pelo procedimento da União Europeia. Apesar destes dois procedimentos serem por excisão de pele e/ou músculo, os mesmos preconizam a retirada de partes diferentes da carcaça, o que pode indicar que na mesma carcaça poderia estar presente mais de um sorotipo de *Salmonella*. Uma explicação para a não detecção da bactéria pelo método Americano pode ser em decorrência da metodologia aplicada neste estudo para comparar os procedimentos em uma mesma carcaça. Antes de se fazer o procedimento de enxaguadura a carcaça foi submetida à remoção de duas porções de 25 g de pele de pescoço, asas e região pericloacal para testar os procedimentos do Brasil e da União Europeia. Caso a contaminação pela bactéria se encontrava limitada a estas partes da carcaça a mesma pode ter sido removida total ou parcialmente, e neste caso, nenhuma ou poucas células foram incorporadas ao líquido de enxágue quando o procedimento dos EUA foi executado. Além disto, pelo procedimento dos EUA, apenas 30 mL (7,5%) dos 400 mL do volume total do líquido de enxágue é usado no pré enriquecimento da amostra. Assim, pode ter ocorrido uma diluição das células de *Salmonella* presentes na carcaça. Esta mesma situação foi também observada em outras três amostragens (Tabela I.3, linhas 4, 16 e 17).

Outro fator observado em relação à variação na detecção de *Salmonella* nas carcaças de frango foi com alguns dos resultados obtidos pelo procedimento dos EUA. Usando diferentes carcaças (Tabela I.3, linhas 3 e 17) ou uma mesma carcaça (Tabela I.2, linhas 3, 13 e 19) a presença de *Salmonella* foi detectada apenas pelo procedimento dos EUA. Isso pode ser explicado pelo fato do procedimento de enxágue ser feito tanto na cavidade interna quanto na parte externa da carcaça, enquanto que nos outros dois procedimentos há remoção apenas de porções da parte externa da carcaça.

As análises mostraram que resultados falso negativos de *Salmonella* foram obtidos com os três procedimentos de preparo das carcaças de frango testados. Isso ocorreu usando diferentes carcaças, provenientes de um mesmo lote e colhidas num mesmo momento, e, também, quando os três procedimentos foram feitos a partir de uma única carcaça. Resultados falso negativos de *Salmonella* também foram observados por COX et al. (2011) comparando os procedimentos dos EUA e da União Europeia para análise de *Salmonella* em carcaças de frango. Segundo os autores isso pode ter sido

em decorrência da pequena quantidade de amostra (8,3 g) utilizada no método da União Europeia durante o estudo (COX et al., 2011).

Algumas hipóteses podem ajudar a explicar os resultados falso negativos obtidos. Primeiro, a distribuição das células de bactérias nas carcaças de frango não é homogênea (SMITH, 2010). Ainda, muitas células microbianas podem estar firmemente aderidas ou aprisionadas na pele e nos músculos da carcaça, o que pode dificultar a remoção durante o preparo das amostras (MEAD et al., 2010). As amostras usadas em cada um dos três procedimentos testados foram provenientes de diferentes partes da carcaça ou obtidas de diferentes formas. Usando os procedimentos do Brasil e da União Europeia, 1,0 a 2,1% do peso das carcaças foram usados no pré-enriquecimento das amostras uma vez que as carcaças analisadas neste estudo pesavam de 1,2 a 2,5 Kg. Desta forma, se as células de *Salmonella* não estavam presentes nas porções removidas da carcaça, sua presença não foi detectada. Para fazer o procedimento de enxaguadura adotado pelos EUA foi usado 7,5% do volume total de enxágue das carcaças para efetuar o pré-enriquecimento. Geralmente, quando presente, há poucas células de *Salmonella* nas carcaças de frango (SIMMONS et al., 2003; ANVISA, 2008). KING et al. (2008) analisaram carcaças de frango com incubação de diferentes volumes do líquido de enxágue e constaram que, com incubação de 30 mL, *Salmonella* foi encontrada em 20% das amostras analisadas. Quando 50 mL do enxágue foi incubado, 37,8% das amostras foram positivas e com 400 mL de líquido de enxágue incubado foi detectado 47,8% de positividade. Os autores concluíram que, quando o mesmo procedimento, mas diferentes volumes de líquido para o pré enriquecimento são usados, a prevalência de *Salmonella* variou de 20 a 47,8%.

A segunda hipótese que pode contribuir para explicar os resultados de *Salmonella* obtidos está relacionada à natureza dos procedimentos que foram comparados. Os procedimentos de excisão (Brasil e União Europeia) removem e utilizam na análise todas as bactérias presentes na porção do tecido, inclusive aquelas aderidas firmemente (ISO, 2003; CAPITA et al., 2004). Neste caso, mesmo que as células bacterianas estejam firmemente aderidas ao tecido, elas estarão presentes na porção incubada para o pré enriquecimento. Por outro lado, isso não acontece com o

procedimento dos EUA. O procedimento de enxágue recupera apenas as bactérias aderidas fracamente à carcaça e que estão nas superfícies externas da mesma (CAPITA et al., 2004). Outro fator importante refere-se à homogeneização das amostras. Os procedimentos de excisão dos tecidos permitem a homogeneização da amostra em equipamentos mecânicos. Por outro lado o procedimento de enxágue acessa as partes interna e externa da carcaça, mas a homogeneização da amostra com o diluente é manual. Segundo COSSI et al. (2012), a homogeneização é um fator crítico que pode comprometer o isolamento dos micro-organismos presentes na carcaça de frango.

A terceira hipótese para explicar os resultados falso negativos de *Salmonella* entre os procedimentos comparados pode estar relacionada com a forma da contaminação das carcaças. O resfriamento em chiller com água é uma importante etapa onde a contaminação cruzada entre carcaças pode ocorrer (SMITH et al., 2005; HUEZO, 2007). Após a passagem pelo chiller as carcaças podem apresentar uma alta prevalência de *Salmonella*, porém, em baixas quantidades (EFSA, 2006; ANVISA, 2008). No Brasil e nos EUA, o resfriamento das carcaças de frango é, predominantemente, o de imersão em água. Por outro lado, na União Europeia o resfriamento das carcaças ocorre com ar (MAPA, 1998; SHINE et al., 2012). Neste trabalho foi comparado o procedimento oficial da União Europeia de preparo das carcaças de frango para análise de *Salmonella* em um processo de abate com resfriamento por imersão em água, no qual a dinâmica de contaminação das carcaças de frango pode ser diferente do que um processo de resfriamento a ar.

Os procedimentos de preparo das carcaças de frango para análise de *Salmonella* usados pelo Brasil, União Europeia e EUA fazem parte de programas oficiais destes governos para avaliar os estabelecimentos de abate de frangos sob inspeção oficial (MAPA, 2003; EC, 2007; FSIS, 2012). No Brasil as análises são requeridas de acordo com a quantidade de animais abatidos. Por exemplo, para abatedouros com abate superior a 100.000 animais/dia é requerido análise de uma carcaça por turno de abate. A cada 51 carcaças analisadas é completado um ciclo de amostragem onde, no Brasil é admitido 12 (23,5%) resultados positivos para *Salmonella* (MAPA, 2003). Já nos EUA é admitido oito amostras positivas em 51 carcaças analisadas, ou 15,7% (FSIS,

2012). Por outro lado, na União Europeia, devem ser colhidas semanalmente, no mínimo, amostras de 15 carcaças escolhidas aleatoriamente. De cada carcaça é retirada uma amostra de cerca de 10 g da pele do pescoço, devendo-se combinar amostras de pele do pescoço de três carcaças antes da análise, de modo a obter cinco amostras semanais de 25 g (EC, 2007). Na União Europeia são admitidos 5 resultados positivos ou 10% de positividade por ciclo de amostragem de 50 carcaças (EC, 2011). Em todos estes programas a avaliação do desempenho do abatedouro é verificada por ciclo de amostragem e não por resultado de cada carcaça analisada (MAPA, 2003, EC, 2007; EC, 2011; FSIS, 2012).

Considerando o percentual de positividade de *Salmonella* obtido neste estudo em comparação com o percentual admitido nos programas do Brasil (23,5%) da União Europeia (10%) e dos EUA (15,7%) para avaliar o desempenho do abatedouro de onde as amostras foram colhidas, o mesmo teria sido reprovado pelos resultados obtidos pelo procedimento da União Europeia. Usando diferentes carcaças, o procedimento da União Europeia detectou 12,5% de positividade de *Salmonella* enquanto que o programa Europeu admite apenas 10% de positividade. Usando uma única carcaça para comparar os três procedimentos, o abatedouro teria sido reprovado no critério da União Europeia por ter sido obtido 15% de positividade.

Segundo o acordo sobre aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio (OMC), em seu artigo 4º, os países membros aceitarão as medidas de outros membros como equivalentes para situações de exportação, mesmo se tais medidas diferem de suas próprias medidas (MIRANDA, et al., 2004). Segundo CASON et al. (2010), a demonstração de equivalência pode ser difícil quando há diferenças consideráveis nos testes regulatórios requeridos em outros países. Estes autores avaliaram a probabilidade estatística de aprovação de ciclos de amostragem considerando as diferenças de preparo das carcaças de frango adotados pelos EUA e pela União Europeia. Os autores concluíram com base no histórico de prevalência de *Salmonella* em carcaças e produtos de frango destes países que a taxa de aprovação dos ciclos, seria de 79,3% usando o procedimento dos EUA e de 79,5% usando a amostragem e procedimento da União Europeia, mesmo com as diferenças nos planos de amostragem (CASON et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que não há diferenças significativas entre os resultados de *Salmonella* obtidos pelos três procedimentos testados. No entanto, o ideal é que os procedimentos para uso em programas oficiais fossem padronizados. Segundo MEAD et al. (2010), as estratégias de amostragem deveriam ser definidas de acordo com os riscos envolvidos na saúde pública, com a prevalência do micro-organismo alvo, com o nível de confiança para os resultados obtidos e pelos princípios gerais de estatística.

3.2 COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DO BRASIL, UNIÃO EUROPEIA E EUA DE PREPARO DE CARÇAÇAS DE FRANGO PARA ANÁLISES DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE

Escherichia coli, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos, foram escolhidos para comparar os três procedimentos de preparo das amostras pelo fato destes serem os mais comumente usados para avaliar a qualidade microbiológica de carcaças de frango bem como a higiene do processo de abate (EC, 2007; GHAFIR et al., 2008). Além disso, também podem ser usados em avaliações oficiais de carcaças de frangos em diferentes países (FSIS, 1996; MAPA, 2007; EC, 2007).

A presença (contagens ≥ 10 UFC/g) de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos obtidas pelos três procedimentos de preparo das carcaças de frango é mostrada na Tabela I.4. Quando diferentes carcaças foram usadas, *E. coli* foi detectada em 100% das amostras analisadas com o procedimento da União Europeia mas em apenas em 93,5% das amostras analisadas pelos outros procedimentos (Brasil e EUA). A presença de coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos foi de 100% das amostras e procedimentos testados (Brasil, União Europeia e EUA).

Quando uma mesma carcaça foi usada (Tabela I.4), *E. coli* foi detectada em 100% das amostras analisadas com o procedimento do Brasil mas apenas em 96,7% pelo procedimento da União Europeia e em 93,5% pelo procedimento dos EUA.

Enterobacteriaceae foi encontrada em todas as amostras analisadas com o procedimento do Brasil e da União Europeia, mas apenas em 96,7% das amostras analisadas com o procedimento de enxaguadura (EUA). Coliformes totais e aeróbios mesófilos foram encontrados em todas as amostras e por todos os procedimentos testados.

Tabela I.4. Presença de *E. coli* (EC), coliformes totais (CT), *Enterobacteriaceae* (EB) e aeróbios mesófilos (AM) em carcaças de frango após o chiller em água usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça

Procedimento de preparo ¹	Prevalência (%) ²							
	Diferentes carcaças				Mesma carcaça			
	EC	CT	EB	AM	EC	CT	EB	AM
Brasil	93,5	100	100	100	100	100	100	100
UE	100	100	100	100	96,7	100	100	100
EUA	93,5	100	100	100	93,5	100	96,7	100

¹ Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloacal; UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço; EUA (Estados Unidos da América) - enxaguadura da carcaça.

² A prevalência foi determinada quando as contagens tiveram ≥ 10 UFC/g.

Os resultados mostram que o tipo de procedimento usado para preparar as carcaças para as análises microbiológicas pode afetar a detecção de alguns tipos ou grupos de bactérias presentes. De um modo geral, quando diferentes carcaças foram utilizadas, o procedimento da União Europeia foi o que demonstrou melhor desempenho para detectar contagens ≥ 10 UFC/g de todos os tipos e/ou grupos de micro-organismos testados. Por outro lado, quando uma mesma carcaça foi usada para a retirada da amostra, o procedimento do Brasil foi o mais eficiente para quantificar os mesmos. COSSI et al. (2011) avaliaram quatro procedimentos de preparo de carcaças (enxaguadura, suabe da pele, excisão de músculo e excisão da pele) e observaram que, de um total de 60 amostras analisadas, *E. coli* foi detectada em 48 delas, sendo que apenas o procedimento de suabe da pele foi menos eficiente para detectar a presença da bactéria e diferiu estatisticamente dos demais procedimentos.

Na Tabela 1.5 estão descritas as médias das contagens e seus desvios padrão de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos usando os diferentes procedimentos de preparo das carcaças em diferentes e em uma mesma carcaça. Usando diferentes carcaças, resultados médios significativamente superiores (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) foram observados nas contagens de *E. coli* e coliformes totais usando o procedimento dos EUA em comparação aos demais procedimentos (Brasil e União Europeia). Para *Enterobacteriaceae*, o procedimento de preparo das carcaças usado pelo Brasil foi significativamente inferior (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) aos procedimentos praticados na União Europeia e nos EUA. Não foram encontradas diferenças significativas usando os três procedimentos de preparo das carcaças para as contagens de aeróbios mesófilos (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$).

Quando foi utilizada uma mesma carcaça para comparar os três procedimentos de preparo das amostras, os resultados obtidos foram similares àqueles obtidos utilizando diferentes carcaças (Tabela 1.5), exceto para *Enterobacteriaceae* para a qual os procedimentos foram capazes de gerar resultados estatisticamente similares (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$).

Inúmeros trabalhos tem sido feitos para comparar os diferentes procedimentos de preparo das amostras para analisar microbiologicamente carcaças de frango e diferentes resultados tem sido obtido (GILL et al., 2005; COX et al., 2010; COSSI et al., 2012). Segundo GILL et al. (2005), a análise por excisão de porções de tecidos da carcaça ou o enxágue da carcaça geralmente geram em resultados iguais.

O enxágue da carcaça, conforme procedimento adotado pelos EUA, remove as bactérias fracamente ligadas ao tecido (CAPITA et al., 2004) uma vez que, neste procedimento, a fricção do líquido contra a carcaça é executado de forma manual. Entretanto, equipamentos para homogeneização são impraticáveis para o procedimento de enxágue. Segundo RUSSEL et al. (1997), este fato pode afetar a recuperação de alguns grupos de micro-organismos durante a análise.

De acordo com CAPITA et al. (2004), a excisão de partes do tecido recupera uma maior quantidade de bactérias. No entanto, os resultados obtidos neste estudo para as contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* não comprovam as afirmações dos autores.

Tabela 1.5. Comparação de contagens de *E. coli* (EC) coliformes totais (CT), *Enterobacteriaceae* (EB) e aeróbios mesófilos (AM) com três procedimentos de preparo das amostras usando diferentes e uma mesma carcaça

Procedimento de Preparo ¹	Média de contagem de bactérias ± Desvio padrão (Log UFC/g ou mL)							
	Diferentes carcaças ²				Mesma carcaça ³			
	EC	CT	EB	AM	EC	CT	EB	AM
Brasil	2.07 ± 0.47 ^b	2.57 ± 0.46 ^b	3.18 ± 0.38 ^b	4.64 ± 0.40 ^a	2.20 ± 0.46 ^b	2.76 ± 0.40 ^b	3.38 ± 0.38 ^a	4.90 ± 0.43 ^a
EU	2.29 ± 0.46 ^b	2.63 ± 0.39 ^b	3.43 ± 0.38 ^a	4.85 ± 0.42 ^a	2.25 ± 0.30 ^b	2.63 ± 0.37 ^b	3.52 ± 0.49 ^a	4.82 ± 0.22 ^a
EUA	2.77 ± 0.54 ^a	3.14 ± 0.57 ^a	3.65 ± 0.42 ^a	4.75 ± 0.28 ^a	2.71 ± 0.44 ^a	3.08 ± 0.40 ^a	3.63 ± 0.49 ^a	4.76 ± 0.27 ^a

¹ Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloacal; UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço; EUA (Estados Unidos da América) - enxaguadura da carcaça.

² Diferentes carcaças de um mesmo lote foram usadas para comparar os três procedimentos, ³ Uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos.

^{a,b} Médias em uma mesma coluna seguidas de diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p \geq 0.05\%$) pelo teste de Tukey.

COSSI et al. (2012) avaliaram quatro diferentes procedimentos de preparo de carcaças de frango para análise de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene. Os autores observaram que os procedimentos por excisão de partes da carcaça foram os procedimentos capazes de recuperar as maiores quantidades de *E. coli*, coliformes, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos. No entanto, segundo os autores, a excisão do tecido foi estatisticamente superior aos outros procedimentos para as contagens de *E. coli* e coliformes, mas não para as análises de *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos.

Quando se utiliza o procedimento de excisão do tecido, o local da carcaça onde o mesmo é retirado pode ser determinante em relação aos níveis de bactérias encontrados. SMITH (2010) observou que as contagens de bactérias obtidas de diferentes partes das carcaças de frango podem variar. O autor encontrou uma contagem média de *E. coli* de 3,4 Log UFC/mL na região dorsal e de 2,9 Log UFC/mL na região frontal. Para coliformes, as contagens na região dorsal da carcaça foram de 3,7 Log UFC/mL e na região frontal de 3,2 Log UFC/mL. SMITH (2010) também comparou o procedimento de enxágue e de excisão de 25 g para análise de *E. coli* e coliformes em peito e coxa de frango. Diferenças significativas nas contagens obtidas para as duas avaliações foram encontradas entre os procedimentos comparados, sendo que as maiores contagens foram obtidas pelo procedimento de enxágue. GHAFIR et al. (2008) também constaram que o procedimento de enxágue é superior ao procedimento de excisão de 25 g de pele de pescoço para determinar contagens de micro-organismos indicadores em carcaças de frango. O procedimento excisão de 25 g de pele de pescoço é o procedimento oficial na União Europeia, além de ser mais fácil de ser aplicado na prática (HUTCHISON et al., 2006).

De acordo com GILL & JONES (2000), a excisão de partes da carcaça seguida de homogeneização mecânica é o procedimento mais efetivo para a contagem de bactérias porque ele gera resultados mais reais e com menos variação. Entretanto, este fato não foi observado nos resultados obtidos neste estudo onde o procedimento de enxágue, adotado pelos EUA, resultou em contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* mais elevadas do que os procedimentos por excisão seguidos de homogeneização mecânica (Tabela I.4).

Os coeficientes de variação (CV) das contagens de bactérias obtidos com os três procedimentos de preparo das carcaças são mostrados na Tabela I.6. Não foram observadas diferenças significativas (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$) para os CVs obtidos quando diferentes carcaças ou uma mesma carcaça foram usadas no preparo das amostras. Em ambos os casos, as contagem de *E. coli* apresentaram as maiores variações entre todos os procedimentos testados e as contagens de aeróbios mesófilos apresentaram os menores CVs.

Tabela I.6. Coeficientes de variação das contagens de *E. coli* (EC), coliformes totais (CT), *Enterobacteriaceae* (EB) e aeróbios mesófilos (AM) em carcaças de frango usando três procedimentos de preparo das amostras em diferentes e em uma mesma carcaça

Procedimento de preparo ¹	Coeficiente de variação (%) ^b							
	Diferentes carcaças ²				Mesma carcaça ³			
	EC	CT	EB	AM	EC	CT	EB	AM
Brasil	36,0	17,9	11,9	8,6	20,8	14,6	11,1	8,8
EU	20,2	14,6	11,0	8,6	23,3	14,0	13,8	4,5
EUA	33,5	18,1	11,4	6,0	32,2	12,9	13,5	5,8

¹ Brasil - 25 g de pele e músculo das asas, pescoço e pericloal; UE (União Europeia) - 25 g de pele de pescoço; EUA (Estados Unidos da América) - enxaguadura da carcaça.

² Diferentes carcaças de um mesmo lote foram usadas para comparar os três procedimentos; ³ Uma mesma carcaça foi usada para comparar os três procedimentos.

Médias em uma mesma coluna para um mesmo micro-organismos não foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0.05\%$) pelo teste de Tukey.

HUTCHISON et al. (2006) compararam os CVs de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos analisados pelos procedimentos da União Europeia e dos EUA. Os resultados dos CVs obtidos por estes autores foram maiores que os obtidos neste estudo tanto para o procedimento da União Europeia quanto pelo procedimento Americano. Segundo os autores, o procedimento de preparo de carcaças de frango pelo procedimento dos EUA fornece maior variação entre os resultados pelo fato da homogeneização manual da carcaça não ser feita de forma padronizada, sendo também afetados pelas diferentes pessoas executando o procedimento de homogeneização de diferentes formas.

Neste estudo, para a comparação dos procedimentos de preparo das carcaças de frango para análise microbiológica, todas as amostras foram coletadas no abatedouro e transportadas ao laboratório para a retirada das unidades analíticas e subsequente análise. Geralmente, as amostras de pele de pescoço, segundo os preceitos do procedimento Europeu, são colhidas no abatedouro, não sendo necessário remover as carcaças da linha de produção e nem destruí-la para fazer a análise (HUTCHISON et al., 2006; EC, 2007), sendo esta uma vantagem sobre os outros procedimentos. O procedimento de preparo das amostras usado pelos EUA também pode ser feita no abatedouro, sem a necessidade de transportar a carcaça até o laboratório. No entanto, como a carcaça é colocada em contato com o meio de cultura ela precisa ser descartada após o enxágue. Por outro lado, a análise removendo 25 g de partes da carcaça, conforme o procedimento do Brasil (MAPA, 2003), para a análise oficial de *Salmonella*, a carcaça precisa ser transportada para o laboratório, pois requer a adoção de procedimentos laboratoriais mais complexos.

Durante a realização deste estudo foi também avaliado o tempo médio de preparo das amostras de carcaças de frango utilizando cada um dos procedimentos testados. Para a realização dos procedimentos do Brasil e da União Europeia, foram necessários em média 2,4 min para retirar a unidade analítica da carcaça, adicionar o diluente e homogeneizar a amostra. Para o procedimento dos EUA foram necessários 3,7 min para adicionar os 400 mL de meio de cultura, enxaguar a carcaça interna e externamente de forma manual, remover os 30 mL do líquido de enxágue e adicionar outros 30 mL restantes para preparar a amostra. O tempo necessário para preparar as carcaças pelo procedimento dos EUA foi 35,1% mais moroso do que o tempo necessário para praticar os procedimentos do Brasil e da União Europeia. Este tempo, aplicados à análise de uma carcaça pode, na prática, não representar diferenças na rotina de um laboratório. Entretanto, quando o volume de amostras for elevado, o tempo requerido pode ter grande significado em termos de produtividade. Este tempo de preparo de amostras foram similares aos obtidos por HUTCHISON et al. (2006) no preparo de 20 carcaças, usando o procedimento dos EUA - 2,9 min por carcaça. Entretanto, para a remoção da pele de pescoço, estes pesquisadores precisaram de apenas 0,56 min por carcaça. Uma possível explicação para o menor tempo requerido,

pode estar associada ao fato de terem coletado as amostras diretamente na linha de produção, diferente do procedimento adotado neste estudo, no qual as amostras foram preparadas no laboratório.

4 CONCLUSÕES

Os procedimentos de preparo de amostras de carcaças de frango para análise de *Salmonella* usados pelo Brasil, União Europeia e EUA são equivalentes quando comprados em diferentes carcaças ou em uma única carcaça. Resultados falso negativos de *Salmonella* foram obtidos com todos os procedimentos testados e isso pode estar relacionado com fatores como heterogeneidade da contaminação por *Salmonella* nas carcaças de frango, natureza intrínseca de cada procedimento e formas de contaminação da carcaça durante o abate. Com relação às análises de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene, o procedimento dos EUA permitiu encontrar as maiores quantidades de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*, mas foi equivalente aos demais procedimentos para a análise de aeróbios mesófilos. Os procedimentos de coleta e preparo de amostras do Brasil e da União Europeia foram 35,1% menos morosos em comparação ao procedimento dos EUA. O ideal seria uma harmonização internacional referente ao procedimento de preparo de carcaças de frango para análises microbiológicas. Com isso, os resultados dos programas oficiais dos países poderiam ser comparados em uma mesma base de informações, bem como os resultados de pesquisas e outras avaliações de qualidade e higiene dos produtos avícolas.

CAPÍTULO II - MAPEAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS E INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ABATE DE FRANGOS

1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi mapear microbiologicamente a presença de micro-organismos patogênicos e indicadores de qualidade e higiene e as fontes potenciais de contaminação de carcaças nas principais etapas do abate de frangos. Os objetivos específicos foram: i) avaliar a presença de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* e suas disseminações ao longo das etapas de abate; e ii) determinar as contagens de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene das carcaças nas mesmas etapas e condições.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Abatedouro

As carcaças para análise foram obtidas de um abatedouro comercial localizado na região oeste do estado de Santa Catarina que processava frangos com aproximadamente seis (6) semanas de idade sob condições industriais típicas de abate (Figura 3). O abatedouro opera com Serviço de Inspeção Federal (SIF) e sistema de APPCC implantado, conforme requisitos do MAPA (MAPA, 2006) e testes microbiológicos de produtos (MAPA, 2005a).

2.1.2 Coleta das carcaças

Dez diferentes lotes de frangos foram avaliados no período de outubro de 2011 a março de 2012. Um lote foi definido como um grupo de animais mantidos em uma mesma granja durante o mesmo período de tempo e abatidos no mesmo momento e de forma ininterrupta após o início. De cada lote, foram colhidas diretamente da linha de abate uma carcaça de frango de cada um dos locais indicados na Tabela II.1, de acordo com a Figura 3.

Tabela II.1. Locais de coleta de carcaças de frango durante o abate

Locais de coleta das carcaças:	Etapas (Figura 3)
Antes da escaldagem	8
Após a escaldagem	8
Após a depenagem	9
Antes da evisceração	14
Após a evisceração – retirada das vísceras	19
Carcaça com contaminação fecal aparente (CFA)	24
Carcaça sem CFA	24
Carcaça após o refile da CFA	24
Após o chuveiro final	25
Após o resfriamento	31

As carcaças (n=100) foram colhidas em condições assépticas e acondicionadas individualmente em embalagens plásticas estéreis, identificadas e transportadas ao laboratório para análise de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, Coliformes totais e *E. coli*. As análises foram feitas no laboratório da indústria onde as amostras foram colhidas.

No laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C até o momento da análise, a qual foi iniciada em até duas horas após a coleta. No momento da análise, a parte externa de cada embalagem contendo as carcaças foi sanitizada com álcool 70%. O líquido foi friccionado com auxílio de algodão estéril para sanitizar e remover eventuais sujidades aderidas à embalagem.

Em uma capela de fluxo laminar, 400 mL de água peptonada e tamponada (APT) 0,1% (Oxoid CM 509, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados em cada embalagem contendo as carcaças. O caldo da APT 0,1% (Oxoid CM 509, Darmstadt, Alemanha) foi usado para lavar a carcaça interna e externamente durante 60 s. Posteriormente, a carcaça foi removida do caldo e este foi submetido à homogeneização durante 60 s em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil). Alíquotas de cada amostra preparada foram tomadas para análise de *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos. Para a análise de *Salmonella*, 30 mL do caldo de lavagem das carcaças foram incorporados a 30 mL de APT (Oxoid CM 509, Darmstadt, Alemanha) em concentração dupla. A amostra foi então homogeneizada por 60 s. e usada para a análise (FSIS, 1996).

2.1.3 Coleta das amostras de água

No mesmo momento da coleta das carcaças foram colhidas amostras de água do tanque de escaldagem (n=10) e dos tanques de pré-resfriamento (n=10) e de resfriamento de carcaças (n=10). De cada amostra de água, um volume de aproximadamente 300 mL foram colhidos em frascos de plástico estéreis. Após a colheita das amostras os frascos foram fechados, identificados e enviados para o laboratório para análise de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli*.

No laboratório as amostras foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C por no máximo 2 h até o momento das análises. A parte externa de cada frasco foi higienizada com álcool 70% e os mesmos foram agitados vigorosamente. Em uma capela de fluxo laminar, alíquotas da amostra foram retiradas para análise de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli*. Para a análise de *Salmonella*, 25 g da amostra foi adicionada em 225 mL de APT (Oxoid CM 509, Darmstadt, Alemanha) em concentração tripla. A amostra foi então homogeneizada por 60 s e usada para análise.

2.2 MÉTODOS

As amostras preparadas no item 2.1.2 e 2.1.3 foram submetidas às análises de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos.

2.2.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Pré-Enriquecimento das amostras: as amostras preparadas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 21 ± 3 h em incubadora (Fanen 347 CD, São Paulo, SP, Brasil).

Extração do DNA: após o pré-enriquecimento, foi feita a lise celular e a extração do DNA (ácido desoxirribonucleico). O reagente, solução tampão lysis + protease, foi preparado pela adição de 150 µL de protease e 12 mL de solução tampão, ambos fornecidos prontos pela Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA). Foram adicionados nos tubos de lise 200 µL da solução tampão lysis + protease e 10 µL da amostra pré-enriquecida. Os tubos foram levados para blocos de aquecimento a 37 ± 2 °C durante 20 min e, posteriormente, a 95 ± 3 °C por 10 min. Após as duas etapas de aquecimento, as amostras foram transferidas para o bloco de refrigeração e mantidas em geladeira por no máximo, 48 h. As amostras foram retiradas da geladeira 5 min antes de iniciar a etapa subsequente.

Preparo da amostra e reação nos tubos de PCR: foram adicionados aos tubos de PCR BAX® System *Salmonella*, 50 µL da solução de lise contendo o DNA extraído. Os tubos de PCR foram levados para o termociclador/detector do equipamento BAX® System Q7 Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA), previamente preparado para a análise de *Salmonella*. O tempo de detecção e leitura, geralmente de 3 h e 30 min, foi controlado e indicado pelo Sistema BAX® System Q7.

No final da etapa de reação o resultado de cada amostra analisada foi mostrado como positivo ou negativo, diretamente na tela do computador através do programa do equipamento BAX® System Q7. O resultado obtido como negativo no equipamento BAX® System Q7 foi considerado como negativo definitivo e o resultado obtido como positivo foi considerado positivo presuntivo.

Os resultados presuntivos positivos foram confirmados pelo método bacteriológico segundo o método ISO 6579 (ISO, 2002). Alíquotas de 0,1 mL de cada amostra pré-enriquecida, mantida em geladeira entre 5 ± 3 °C foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 9,9 mL de meio Rappaport Vassiliadis (Merck, Darmstad, Germany) e 1 mL para 9 mL de caldo tetrionato-verde brilhante (Merck, Darmstad, Germany). Os tubos de meio de Rappaport Vassiliadis foram incubados a $41,5 \pm 1$ °C em banho maria (Fanen, São Paulo, SP, Brasil) e de tetrionato-verde brilhante a 36 ± 1 °C em incubadora (Fanen 347 CD, São Paulo, SP, Brasil), ambos por 21 ± 3 h. Após a incubação, cada amostra enriquecida em Rappaport Vassiliadis e em tetrionato-verde brilhante foi estriada em placa contendo ágar verde brilhante (Merck, Darmstad, Germany) e placa contendo ágar XLT4 (Merck, Darmstad, Germany). Todas as placas foram incubadas por 21 ± 3 h a 36 ± 1 °C e então examinadas quanto à presença ou não de colônias suspeitas de *Salmonella*. Colônias suspeitas de *Salmonella* foram identificadas bioquímica e sorologicamente. Os testes bioquímicos incluíram as avaliações da produção de urease, fermentação da glucose, sacarose e lactose em ágar três açúcares e ferro (TSI) (Merck, Darmstad, Germany), descarboxilação da lisina, produção de H₂S, motilidade e produção de indol. O teste sorológico foi realizado com soro polivalente O (Probac, Brazil). Os isolados de *Salmonella* foram enviados para identificação sorológica no laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro.

2.2.2 Pesquisa e contagem de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari*

A partir das amostras preparadas foram retiradas alíquotas para a extração do DNA e para a análise bacteriológica.

Extração do DNA: foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.2.1 para a análise de *Salmonella* apenas usando 5 µL da amostra.

Preparo da amostra e reação nos tubos de PCR: foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.2.1 para a análise de *Salmonella* apenas usando os tubos de PCR BAX® System Real-Time *Campylobacter jejuni/coli/lari* e 30 µL da solução de lise contendo o DNA extraído.

No final da etapa de reação os resultados foram mostrados para cada amostra como positivo ou negativo, diretamente na tela do computador através do programa do Sistema BAX® System Q7. O resultado negativo foi considerado como negativo definitivo e o resultado positivo no BAX® System Q7 foi considerado positivo presuntivo. Os resultados positivos presuntivos foram submetidos à confirmação pelo método ISO 10271-1 (ISO, 2006). Para análise bacteriológica, uma alíquota de 1 mL da amostra preparada, mantida em geladeira entre 5 ± 3 °C, foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Bolton (Oxoid CM 983, Basingstoke, Hampshire, UK), adicionado de suplemento contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida (Oxoid SR 183E, Basingstoke, Hampshire, UK). Os tubos foram incubados a $41,5 \pm 1$ °C por 24 h em microaerofilia. Posteriormente, a cultura foi estriada na superfície de meio mCCDA (modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar, Oxoid CM 739, Basingstoke, Hampshire, UK) contendo em sua composição suplemento seletivo (Oxoid SR 155, Basingstoke, Hampshire, UK). As placas foram incubadas a $41,5 \pm 1$ °C por 48 h em microaerofilia. Colônias características de *Campylobacter* em mCCDA foram confirmadas como *Campylobacter* spp por testes morfológicos, motilidade, crescimento microaerófilo a 25 °C e oxidase.

2.2.3 Contagem de *E. coli* e coliformes totais

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-5} foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6414, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 ± 2 h e, posteriormente, foram submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Nestas placas as colônias de *E. coli* foram caracterizadas por apresentarem coloração azul com bolhas de gás e as colônias de coliformes totais por colônias vermelhas com a presença de gás. As contagens de *E. coli* e coliformes totais foram determinadas conforme procedimento do USDA (USDA, 1998).

2.2.4 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-6} foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6421, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a

36 ± 1 °C por 24 ± 2 h e, posteriormente, submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Foram contadas como colônias de *Enterobacteriaceae* as que apresentavam coloração vermelha associadas apenas com formação de gás; colônias vermelhas associadas apenas com zonas ácidas de coloração amarela e colônias vermelhas associadas com formação de gás e com zonas ácidas de coloração amarela, conforme orientação do fabricante. As contagens de *Enterobacteriaceae* foram determinadas conforme AOAC (2003).

2.2.5 Contagem de aeróbios mesófilos

Alíquotas de 1 mL das diluições 10⁻³ a 10⁻⁷ foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6400, St. Paul, MN, EUA). As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 48 ± 4 h e, posteriormente, submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Foram contadas como colônias de aeróbios mesófilos as que apresentavam coloração vermelha, conforme orientação do fabricante. As contagens de aeróbios mesófilos foram determinadas conforme procedimento do USDA (USDA, 1998).

2.2.6 Cálculo dos resultados das contagens de micro-organismos

Quando o procedimento dos EUA foi usado, as UFC/g foram calculadas usando a fórmula $\text{UFC/g} = (\text{UCF} \times \text{V} \times \text{D}) / \text{P}$, sendo UFC = unidades formadoras de colônias obtidas na placa, V = volume de APT usada para lavar a carcaça (400 mL), D = diluição usada na placa e P = peso da carcaça.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos resultados de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* e suas disseminações ao longo do processo de abate de frangos foi usado estatística descritiva, comparando as presenças e ausências das bactérias nas carcaças colhidas nas diferentes etapas de abate. Para a avaliação das contagens de *E. coli*, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos, os resultados em UFC/g foram

transformados em Log₁₀ de UFC/g ou mL. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa estatístico XLSTAT versão 2009.5.01AddinsolftTM USA, New York, NY).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRESENÇA DE *SALMONELLA*, *C. JEJUNI*, *C. COLI* E *C. LARI* E SUAS DISSEMINAÇÕES AO LONGO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ABATE DE FRANGOS

Frangos saudáveis entram no abatedouro carregando milhões de bactérias (CASON, 2004; CASON et al., 2007; DIONE et al., 2009) e durante o abate contaminações cruzadas podem ocorrer pelo contato com os equipamentos e ambiente (RASSCHAERT et al., 2008). Nesta etapa do estudo, as presenças de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* foram determinadas nas carcaças colhidas nas principais etapas do processo de abate de frangos.

Não foi detectado as presenças de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em nenhuma das amostras de carcaças colhidas nas diferentes etapas e de águas de escaldagem e de resfriamento analisadas. Estes resultado são diferentes dos obtidos em outros estudos que, geralmente, mostram uma alta prevalência de *Campylobacter* em carcaças de frango. A presença de *Campylobacter* tem sido encontrada em carcaças de frango na ordem de 36,9% (ARSENAULT et al., 2007), 44,8% (CHRYSTAL et al., 2008), 37,1% (PEPE et al., 2009), 6,3% (MARAMAE et al., 2010). REITER et al. (2005) encontraram *Campylobacter* spp em 20% das amostras de carcaças de frango antes da depenagem, em 30% após a depenagem, em 33,3% antes da evisceração, em 16,7% antes do resfriamento e em 20% após o resfriamento. Nas amostras de água da escaldagem e do resfriamento de carcaças, estes autores encontraram a presença de *Campylobacter* spp em 30 e 6,7% das amostras, respectivamente. CORTEZ et al. (2006) detectaram uma positividade média de *C. jejuni* em 4,9% das amostras colhidas

durante diferentes etapas do abate de frangos. Segundo os autores, a mais alta prevalência foi encontrada em fezes com 22,2% das amostras positivas, seguida de penas e carcaças evisceradas com 5,6% cada e em água de escaldagem e água de evisceração com 2,8% (CORTEZ et al., 2006).

Alguns fatores parecem estar associados com a presença ou não de *Campylobacter* em carcaças de frango. Lotes de frangos contaminados com *Campylobacter* possuem a probabilidade 30 vezes maior de resultarem em carcaças contaminadas com a bactéria. Carcaças de frango contaminadas com a bactéria também podem derivar de lotes não contaminados, implicando em uma possível contaminação cruzada durante o abate. A contaminação de carcaças de frango com *Campylobacter* varia entre os diferentes abatedouros e em relação às quantidades da bactéria encontradas nas carcaças. Isso indica que alguns abatedouros são mais capazes de controlar *Campylobacter* durante as operações de abate do que outros. Outros fatores também podem estar relacionados com o aumento no risco de contaminação das carcaças por *Campylobacter*, como por exemplo a idade de abate das aves, sazonalidade e hora de abate (EFSA, 2010a).

Por outro lado, a presença média de *Salmonella* foi detectada em 9,2% das amostras de carcaças e águas colhidas nas principais etapas do abate. Na Tabela II.2 é mostrado o número de amostras positivas e o percentual de positividade de *Salmonella* encontrada em cada etapa. Os resultados obtidos mostram que *Salmonella* não foi encontrada nas amostras colhidas em cinco das 13 etapas do processo avaliadas. As etapas nas quais *Salmonella* não foi encontrada são: água de escaldagem, carcaças após a depenagem, carcaças após a evisceração, carcaças após o chuveiro final e água de resfriamento. Nas outras etapas, a presença de *Salmonella* nas amostras variou de 10 a 30% (Tabela II.2).

Na primeira etapa avaliada, ou seja, antes da escaldagem, 30% das amostras de carcaças colhidas foram positivas para *Salmonella*. No entanto, nas amostras de água da escaldagem, colhidas no mesmo momento das carcaças, em nenhuma delas foi detectada a bactéria. Estes resultados indicam que a etapa de escaldagem é uma importante barreira para controlar *Salmonella* durante o abate. Porém, esta barreira pode não ser completamente eficiente pois, uma amostra de carcaça colhida após a

escaldagem foi positiva, o que indica que a bactéria pode sobreviver e ultrapassar esta etapa aderida às carcaças. Em carcaças de frangos, a presença de *Salmonella* pode estar presente nas penas, pele, patas, intestino e fezes (CASON et al., 2007; DIONE et al., 2009) e isso pode ser suficiente para arrastar a bactéria ao longo do processo de abate. Neste estudo, nos dias de coleta das amostras, a temperatura da água de escaldagem variou de 60 a 62 °C. CANSIAN et al. (2005) encontraram *Salmonella* em 28,6% das amostras de água de escaldagem de um abatedouro de frangos no Brasil. REITER et al. (2007) encontraram *Salmonella* em 16,7% das amostras de água da escaldagem colhidas em um abatedouro de frangos.

Tabela II.2. Presença de *Salmonella* em carcaças de frango e águas do processo nas principais etapas do abate

Amostras	No. de amostras positivas
	(%)
Carcaça antes da escaldagem	3 (30)
Água de escaldagem	0 (0)
Carcaça após a escaldagem	1 (10)
Carcaça após a depenagem	0 (0)
Carcaça antes da evisceração	1 (10)
Carcaça após a evisceração	0 (0)
Carcaça com CFA	1 (10)
Carcaça sem CFA	1 (10)
Carcaça após o refile da CFA	1 (10)
Carcaça após o chuveiro final	0 (0)
Carcaça após o resfriamento	3 (30)
Água de pré resfriamento	1 (10)
Água de resfriamento	0 (0)
Total	12 (9,2)

CFA= Contaminação Fecal Aparente.

Nas amostras sem e com CFA e nas amostras após o refile da CFA foi encontrado *Salmonella* em 10% em cada uma das três etapas avaliadas. Isso demonstra que

mesmo nas carcaças sem a CFA e nas que a CFA foi removida pelo refil a bactéria estava presente. No Brasil, a presença de contaminação gastrointestinal e biliar nas carcaças de frango no final da evisceração, antes do resfriamento, é um indicador da presença de *Salmonella* e, portanto, nenhuma carcaça pode conter estas contaminações antes da etapa de lavagem das carcaças (MAPA, 2006).

As carcaças colhidas após o resfriamento apresentaram 30% de positividade de *Salmonella*, sendo que na água do pré resfriamento a bactéria também foi encontrada (10%). Segundo SMITH et al. (2005) e HUEZO (2007), o resfriamento das carcaças em água é uma importante etapa na qual a contaminação cruzada por *Salmonella* pode ocorrer. CANSIAN et al. (2005) não encontraram a presença de *Salmonella* na água de resfriamento de carcaças, apesar da bactéria ter sido identificada em etapas anteriores do abate. Segundo os autores, a não detecção de *Salmonella* na água de resfriamento pode ser atribuída ao uso de 5 ppm de cloro na mesma. Segundo MEAD & THOMAS (1973), a redução na contaminação microbiana na etapa de resfriamento não é devido aos níveis de cloro quando ele é adicionado a água e sim, pela ação mecânica que o resfriamento em água ocasiona nas carcaças. REITER et al. (2007) encontraram 3,3% das amostras de carcaças colhidas após o resfriamento em água positivas para *Salmonella* sendo que na água de resfriamento das carcaças a bactéria foi encontrada em 6,7% das amostras.

Após o resfriamento, as carcaças apresentam uma alta prevalência de *Salmonella*, porém, em baixas quantidades (EFSA, 2006). SMITH et al. (2005) afirmam que a etapa de resfriamento é insuficiente para evitar a contaminação cruzada das carcaças de frango por *Salmonella* e que outras intervenções nesta etapa devem ser feitas, como por exemplo, a adição de cloro ou outro agente antimicrobiano na água de resfriamento. Segundo os autores, o cloro adicionado à água de resfriamento pode eliminar as bactérias suspensas na água, podendo assim reduzir a contaminação cruzada. No Brasil e em outros países, como os da União Europeia, o uso de descontaminantes de carcaças de frangos não é permitido (MAPA, 2004; EC, 2004). A presença de *Salmonella* em carcaças de frangos colhidas em diferentes etapas do abate pode variar de acordo com a realidade de cada planta e com a metodologia do estudo. Em carcaças colhidas após a etapa de evisceração, ARSENAULT et al. (2007)

encontraram 31,2% de amostras positivas para *Salmonella* e MAINALI et al. (2009) detectaram 57,1% de positividade. BILGILI et al. (2002) observaram a presença de *Salmonella* em 20,7% das amostras de carcaças antes do resfriamento.

Resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo foram também observados por REITER et al. (2007). Estes autores avaliaram a presença de *Salmonella* em carcaças de frango colhidas em diferentes etapas do abate e constataram que a bactéria não foi encontrada antes e após a depenagem e antes do resfriamento. No entanto, *Salmonella* foi encontrada em 6,7% das carcaças colhidas antes da evisceração.

Na União Europeia, durante o ano de 2008 foi encontrado uma média de 15,6% de carcaças colhidas após o resfriamento a ar, positivas para *Salmonella*. Entretanto, entre os estados membros da União Europeia a variação de prevalência de *Salmonella* foi de 0% a 85,6%. No Brasil, de outubro de 2003 até julho de 2008 foram colhidas 113.139 carcaças de frango após o resfriamento em água para avaliar a presença de *Salmonella*, referente ao programa de redução de patógenos do MAPA. Destas, 6.860 (6,05%) carcaças estavam contaminadas com *Salmonella* (MAPA, 2010).

Na tabela II. 3 é mostrada a distribuição dos resultados de ausência e presença de *Salmonella* nas diferentes etapa do processo de abate e os sorotipos da bactéria encontrados nas amostras positivas. Do total de 12 amostras de *Salmonella* positivas encontradas nas etapas avaliadas ao longo do processo, quatro (33,3%) eram do sorotipo Senftenberg, três (25%) Mbandaka, duas (16,7%) Newport, uma (8,3%) Infantis e duas (16,7%) não foram sorotipadas (Tabela II.3). Algum destes sorotipos de *Salmonella* têm sido encontrados em isolados provenientes de carcaças de frango do Brasil, porém em baixos percentuais (BARROS DE FREITAS, 2011). Entre os anos de 2004 a 2010, 1.473 amostras de *Salmonella* isoladas em carcaças de frango da região sul do Brasil, pertencentes ao programa de redução de patógenos do MAPA (MAPA, 2003) foram identificadas geneticamente. Destas amostras, 1,36% foram identificadas como *S. Infantis*, 1,29% como *S. Mbandaka* e 0,48% como *S. Newport*. *Salmonella* September não foi encontrada entre as amostras isoladas no sul do Brasil, pertencentes ao programa do governo (BARROS DE FREITAS, 2011).

Tabela II.3. Distribuição da presença de *Salmonella* nas principais etapas de abate de frangos e sorotipos identificados nas amostras positivas

Ponto da coleta das carcaças	Resultados de <i>Salmonella</i> (Sorotipo)									
	Lotes avaliados									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antes da escaldagem	A	P (NS)	A	A	P (Senftenberg)	P (Newport)	A	A	A	A
Água de escaldagem	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Após a escaldagem	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P (MBandaka)
Após a depenagem	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Antes da evisceração	P (Infantis)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Após a evisceração	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Revisão com CFA	A	A	A	A	A	A	P (Senftenberg)	A	A	A
Revisão sem CFA	A	A	A	A	P (Senftenberg)	A	A	A	A	A
Revisão após o refil da CFA	P (MBandaka)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Após o chuveiro final	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Após o resfriamento	A	A	P (NS)	P (Senftenberg)	A	A	A	P (MBandaka)	A	A
Água de pré resfriamento	A	A	A	A	A	P (Newport)	A	A	A	A
Água de resfriamento	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A = Ausência; P = Presença; NS = Não sorotipado; CFA = Contaminação Fecal Aparente.

Os resultados obtidos mostraram que nos lotes 5 e 6 (Tabela II.3) os sorotipos Senftenberg e Newport, respectivamente, foram encontrados em mais de uma etapa do processo, mostrando a disseminação do mesmo sorotipo ao longo do abate. Por outro lado, em um lote foram encontrados dois sorotipos distintos de *Salmonella* (*S. Infantis* e *S. Mbandaka*) em etapas diferentes do processo. Segundo RASSCHAERT et al. (2008), nem todas as contaminações de carcaças de frango por *Salmonella* são provenientes das granjas de criação dos animais. Para os autores, alguns tipos de *Salmonella* são mais bem adaptados aos ambientes e equipamentos de abate, causando assim contaminação cruzada nas carcaças ou podem ser provenientes de lotes contaminados previamente abatidos.

Existem mais de 2.400 diferentes sorotipos de *Salmonella* e suas prevalências mudam constantemente (EFSA, 2009). Em frangos, os sorotipos e suas distribuições na cadeia avícola variam de acordo com a região e o estudo realizado (SUMMER et al., 2004; WHITE et al., 2007; BERRANG et al., 2009; DIONE et al., 2009; BORSOI et al., 2010; EFSA, 2011; MENDONÇA, 2011).

No geral, os resultados de *Salmonella* obtidos neste estudo mostram que ao longo das diferentes etapas do processo de abate de frangos a distribuição da *Salmonella* é aleatória. Por isso, é importante estabelecer barreiras para o controle eficiente da bactéria, bem como, para evitar a contaminação cruzada das carcaças, uma vez que a etapa de escaldagem pode reduzir a contaminação, mas a etapa de resfriamento pode potencializar a contaminação por *Salmonella* devido a permanência das bactérias na água de resfriamento. Este tipo de mapeamento aplicado de forma sistemática é útil para avaliar o desempenho do processo de abate e melhorar as ações do sistema APPCC. Adicionalmente, a avaliação continua dos sorotipos de *Salmonella* obtidos nas diferentes etapas do processo pode ajudar a melhor interpretar a disseminação das salmonelas no processo, bem como as origens das fontes de contaminação, como por exemplo, em equipamentos e ambientes mais complexos.

3.2 CONTAGENS DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE E HIGIENE NAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ABATE DE FRANGOS

As bactérias entram no abatedouro aderidas aos animais, mas também podem ser contaminadas pelos equipamentos, ambientes, manipulação e contato carcaça com carcaça ao longo do processo (CASON et al., 2004; CASON et al., 2007; FRANCHIN et al., 2007). Durante o abate, enquanto algumas etapas do processo podem reduzir os níveis de bactérias presente nas carcaças, outras podem contribuir para aumentá-las (BERRANG & DICKENS, 2000; ROSENQUIST et al., 2006).

Nas avaliações microbiológicas, as contagens de aeróbios mesófilos são freqüentemente usadas como indicador de qualidade e *Enterobacteriaceae*, coliformes e *E. coli* são usadas para avaliar a presença de contaminação entérica e as condições de higiene (GHAFIR et al., 2008). Na Tabela II.4 são mostrados os níveis de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli* nas carcaças colhidas nas diferentes etapas do processo, desde antes da escaldagem até o resfriamento das mesmas em água.

As maiores contagens de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli* foram obtidas nas carcaças antes da escaldagem, ou seja, na primeira etapa onde as amostras foram colhidas. Para aeróbios mesófilos e *E. coli* os resultados antes da escaldagem foram significativamente diferentes das contagens obtidas nas carcaças colhidas nas demais etapas de abate (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

As contagens de *Enterobacteriaceae* e coliformes totais foram significativamente semelhantes (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$) nas carcaças antes da escaldagem em comparação com as carcaças colhidas na etapa de revisão e que apresentavam CFA. Contagens de coliformes totais estatisticamente semelhantes (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$) também foram observadas nas amostras de carcaças antes da escaldagem e nas carcaças após o corte da CFA, colhidas na etapa de revisão. Esses resultados demonstram que nas carcaças que sofreram CFA ou naquelas que a CFA foi removida pelo refil para reduzir os níveis microbiológicos (MAPA, 2006) houve um aumento nos níveis de *Enterobacteriaceae* e coliformes totais em quantidades semelhantes às das

carcaças antes da escaldagem, apesar de ter havido uma diminuição nas contagens microbianas em etapas anteriores a este ponto de coleta (Tabela II.4). Vale destacar que as carcaças colhidas antes da escaldagem foram analisadas com as penas.

Tabela II.4. Contagens de aeróbios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EB), coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) em carcaças de frango colhidas em diferentes etapas do processo de abate

Carcaças: pontos de coleta	Média de contagem de bactérias ± desvio padrão (Log UFC/g)			
	AM	EB	CT	EC
Antes da escaldagem	7,48 ± 0,98 ^a	6,81 ± 0,39 ^a	6,21 ± 0,34 ^a	6,23 ± 0,26 ^a
Após a escaldagem	6,26 ± 0,46 ^b	4,53 ± 0,45 ^{dc}	3,95 ± 0,53 ^b	4,21 ± 0,31 ^b
Após a depenagem	6,05 ± 0,68 ^{bc}	4,82 ± 0,94 ^{bc}	4,18 ± 0,27 ^b	4,30 ± 0,33 ^b
Antes da evisceração	6,12 ± 0,47 ^{bc}	4,99 ± 0,41 ^{bc}	4,49 ± 0,89 ^b	4,55 ± 0,82 ^b
Após a evisceração	6,23 ± 0,46 ^{bc}	4,91 ± 0,48 ^{bc}	4,40 ± 0,57 ^b	4,26 ± 0,58 ^b
Revisão com CFA	6,20 ± 0,29 ^{bc}	5,72 ± 0,33 ^{ab}	4,95 ± 0,58 ^{ab}	4,56 ± 0,62 ^b
Revisão sem CFA	6,24 ± 0,33 ^{bc}	5,02 ± 0,60 ^{bc}	4,61 ± 0,53 ^b	4,30 ± 0,48 ^b
Revisão com refile da CFA	6,02 ± 0,77 ^{bc}	4,94 ± 0,46 ^{bc}	4,76 ± 0,40 ^{ab}	4,26 ± 0,24 ^b
Após o chuveiro final	5,48 ± 0,46 ^c	4,91 ± 0,55 ^{bc}	3,80 ± 1,05 ^b	4,09 ± 0,89 ^b
Após o resfriamento	4,71 ± 0,70 ^d	3,45 ± 0,76 ^d	3,55 ± 0,46 ^b	2,81 ± 0,39 ^c

a, b, c, d Médias em uma mesma coluna seguidas de diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05\%$) baseado no teste de Tukey.

CFA = Contaminação Fecal Aparente

Estudos prévios tem demonstrado que a presença de CFA nas carcaças após evisceração não demonstram impactar negativamente sobre a qualidade microbiológica das carcaças colhidas após processo final de abate, ou seja, após o resfriamento. CASON et al. (2004) observaram que as contagens de *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli* das carcaças contendo contaminação fecal antes do resfriamento não apresentaram diferenças significativas das contagens destes mesmos micro-organismos após a passagem pela etapa de resfriamento. BILGILI et al. (2002) estudaram a influência da presença de conteúdo gastrointestinal em carcaças de frango após a evisceração e concluíram que os níveis de bactérias nas carcaças colhidas antes e após o resfriamento pode variar entre diferentes plantas, mas não entre as carcaças de uma mesma planta contendo ou não contaminação gastrointestinal.

As menores contagens bacterianas foram obtidas nas carcaças após o resfriamento. Diferenças significativas (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) foram obtidas nas contagens desta etapa em comparação com as etapas anteriores do processo, exceto para coliformes totais (Tabela II.4). Para coliformes totais, as carcaças após o resfriamento foram estatisticamente semelhantes às carcaças colhidas desde após a escaldagem até após o chuveiro final, antes do resfriamento (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$). Para as contagens de aeróbios mesófilos e *E. coli* foi observado que os resultados das carcaças após o resfriamento foram estatisticamente diferentes das contagens obtidas nas amostras após o chuveiro final. Estes resultados mostram que o chuveiro final exerce uma considerável redução das contagens microbianas das carcaças.

A Figura II.1 mostra as reduções das contagens microbianas de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli* ao longo do processo, considerando a primeira etapa de avaliação das carcaças em comparação com a última etapa, após o resfriamento em água. Os resultados mostram que a maior redução no processo foi com relação às contagens de *E. coli* com 3,42 Log₁₀ de UFC/g, seguido de *Enterobacteriaceae* com 3,36 Log₁₀ de UFC/g, aeróbios mesófilos com 2,77 Log₁₀ de UFC/g e coliformes totais com 2,66 Log₁₀ de UFC/g.

Na Tabela II.5 são mostrados os resultados de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água de escaldagem, água de pré resfriamento e água de resfriamento das carcaças colhidas durante o processo de abate de frangos. Para as contagens de aeróbios mesófilos não foi observado diferenças significativas (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$) entre os diferentes tipos de amostras de águas analisadas. Para as contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* os resultados obtidos na água de escaldagem foram significativamente menores (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) das contagens obtidas para as águas do pré resfriamento e resfriamento das carcaças.

De acordo com MULDER & VEERKAMP (1974), na etapa de escaldagem são removidas as bactérias presentes nas penas e na pele dos animais sendo que após a imersão inicial das carcaças a água atinge um equilíbrio nos níveis microbianos. Segundo os autores, este equilíbrio é alcançado quando o número de bactérias que

deixam o tanque de escaldagem é igual ao número de bactérias que entram com as carcaças (CASON et al., 2000).

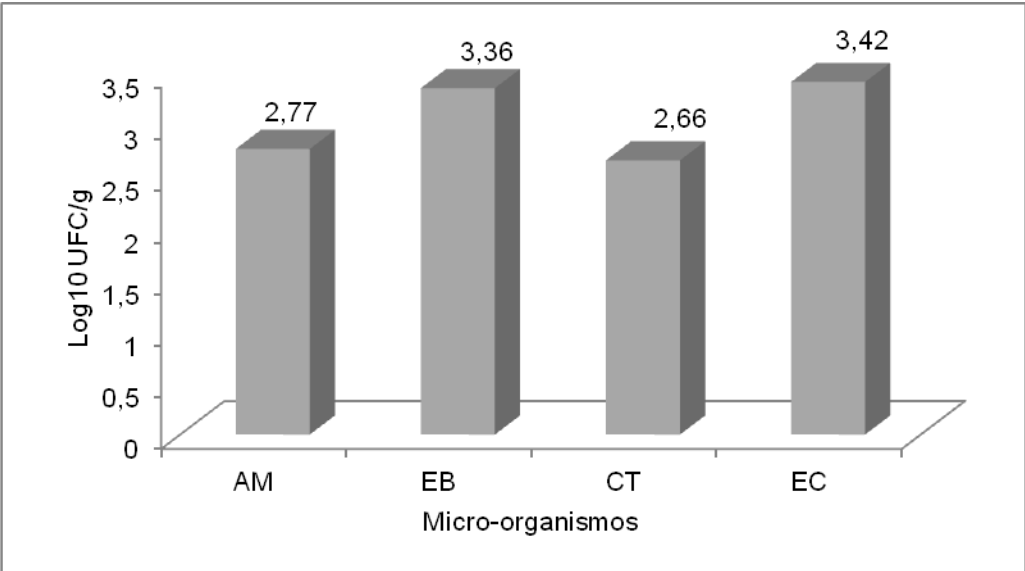


Figura II.1. Reduções em Log₁₀ de UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EB), coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) comparando os resultados de carcaças antes da escaldagem e após o resfriamento.

Tabela II.5. Contagens de aeróbios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EB), coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) em águas de escaldagem, pré resfriamento e de resfriamento de carcaças

Águas:	Média de contagem de bactérias ± desvio padrão			
pontos de coleta	(Log UFC/ mL)			
	AM	EB	CT	EC
Escaldagem	3,82 ± 0,75 ^a	1,74 ± 1,11 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b
Pré resfriamento	4,62 ± 1,06 ^a	3,89 ± 0,52 ^a	3,84 ± 0,09 ^a	2,90 ± 0,15 ^a
Resfriamento	4,87 ± 0,96 ^a	3,45 ± 0,76 ^a	3,07 ± 0,80 ^a	2,80 ± 0,39 ^a

^{a, b} Médias em uma mesma coluna seguidas de diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05\%$) baseado no teste de Tukey.

Para FRANCHIN et al. (2010), o processo de escaldagem é limitado em sua eficiência porque a maioria dos animais carrega material fecal em suas penas. Os resultados obtidos em nosso estudo contradizem as afirmações destes autores. As quantidades de bactérias presentes na água de escaldagem foram inferiores do que as

contagens encontradas nas carcaças após passarem por esta etapa (Figura II.2). Isso sugere que no abatedouro onde o estudo foi feito a renovação de água no tanque de escaldagem foi suficiente para evitar o equilíbrio entre os níveis de bactérias das carcaças com os níveis de bactérias presentes na água de escaldagem. Segundo CANSIAN et al. (2005), o uso da temperatura na faixa de 58 a 62 °C na água de escaldagem é inibitória para a maioria dos micro-organismos, mas sem a capacidade de eliminação total da microbiota presente nesta etapa de abate devido à alta concentração de bactérias.

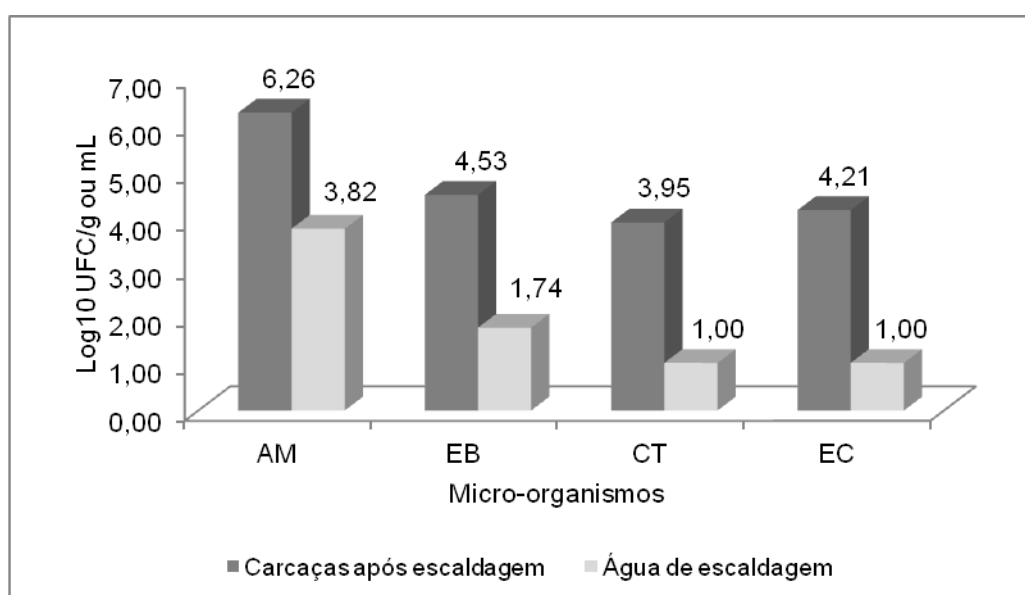


Figura II.2. Comparação das contagens de aeróbios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EB), coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) das carcaças após a escaldagem com as contagens da água de escaldagem.

Ao contrário do observado na etapa de escaldagem, os resultados das contagens obtidas nas carcaças após o resfriamento em comparação com os resultados da água de resfriamento de carcaças mostraram um equilíbrio nos níveis das bactérias (Figura II.3).

Segundo HUEZO (2007), o principal propósito do resfriamento é reduzir a temperatura das carcaças abaixo da temperatura mínima de crescimento da maioria dos micro-organismos, por isso, esta etapa é muito importante. Alguns estudos têm

demonstrado que durante o resfriamento há uma diminuição no número de bactérias nas carcaças de frango (BERRANG & DICKENS, 2000; BILGILI et al., 2002, CASON et

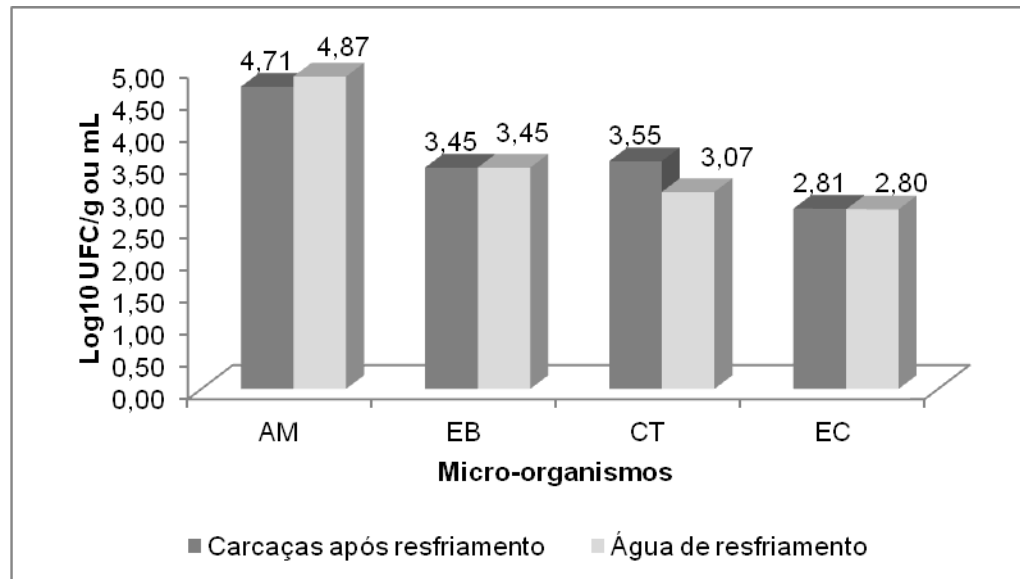


Figura II.3. Comparação das contagens de aeróbios mesófilos (AM), *Enterobacteriaceae* (EB), coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) em carcaças após o resfriamento com as contagens de água de resfriamento das carcaças.

al., 2004). Por outro lado, o resfriamento é um dos principais pontos de contaminação cruzada das carcaças (SMITH et al., 2005) e por isso, precisa ser monitorado (MEAD et al., 2010). De acordo com a legislação Europeia (EC, 1992), a qual serve de modelo para a legislação brasileira (MAPA, 2007), a operação do sistema de resfriamento de carcaças deve ser monitorada microbiologicamente para avaliar os níveis de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* antes e após a passagem das carcaças pelo sistema. Após o resfriamento, foram obtidas reduções de 0,77, 1,46, 0,25 e 1,28 Log UFC/g nos níveis de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. SOUZA et al. (2012) avaliaram as operações do sistema de resfriamento de carcaças de frango após 16 h de trabalho ininterrupto. Segundo os autores, as contagens de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, coliformes e *E. coli* antes do resfriamento foram de 6,17: 4,61: 3,88 e 3,30 Log₁₀ de UFC/g, respectivamente. Após o resfriamento, a média das contagens de aeróbios mesófilos

foi de 4,83 Log₁₀ de UFC/g, de *Enterobacteriaceae* 3,25 Log₁₀ de UFC/g, de coliformes de 2,83 Log₁₀ de UFC/g e de *E. coli* de 1,96 Log₁₀ de UFC/g.

Nos tanques de resfriamento, o movimento das carcaças em direção oposta ao fluxo de água (contra fluxo) remove as bactérias das carcaças e a constante renovação da água dos tanques de resfriamento promove a remoção dos micro-organismos do sistema (SOUZA et al., 2012). Este contra fluxo é importante para manter a qualidade microbiológica desta etapa de abate, reduzindo a probabilidade de contaminação cruzada (PETRAK et al., 1999). A temperatura da água dos tanques de resfriamento e a renovação da água de resfriamento são outros importantes fatores para reduzir a contagem microbiana nas carcaças e controlar o crescimento microbiano. No Brasil, a temperatura da água no sistema de resfriamento não deve ser superior a 16 °C no pré resfriamento e de 4 °C no resfriamento, sendo que as carcaças não devem sair do tanque de resfriamento com mais de 7 °C. Em relação à renovação de água, a legislação brasileira estabelece que deve ser usado 1 L para carcaças com peso inferior a 2,5 kg e de 1,5 L para carcaças entre 2,5 e 5,0 kg (MAPA, 1998). Na União Europeia, a temperatura final das carcaças não deve ser superior a 4 °C, mas não há tempo especificado para atingir tal temperatura (EC, 1992). Nos EUA as carcaças também devem ser resfriadas para atingir a temperatura de 4 °C (FSIS, 1996).

4 CONCLUSÕES

Campylobacter jejuni, *C. coli* e *C. lari* não foram encontradas em nenhuma das amostras de carcaças e de água analisadas nas diferentes etapas do processo de abate de frangos avaliadas. *Salmonella* foi encontrada em etapas aleatórias do processo de abate sendo que a etapa de escaldagem reduziu o percentual de contaminação das carcaças e o resfriamento em chiller com água aumentou a positividade. A etapa de revisão das carcaças, onde é avaliada a presença ou não de contaminação gastrointestinal com posterior remoção da contaminação pelo refile é uma das etapas críticas do abate e pode ser potencialmente responsável por causar contaminação cruzada por *Salmonella*. Mais de um sorotipo de *Salmonella* podem ser

encontrados em carcaças de um mesmo lote de frangos, podendo isso ser em decorrência da contaminação cruzada com o ambiente, equipamentos ou lotes previamente abatidos. Com relação às contagens de micro-organismos foi constatado que a etapa de escaldagem é uma importante etapa de redução dos níveis microbiológicos das carcaças de frango. Assim como observado para *Salmonella*, para *Enterobacteriaceae* e coliformes totais a etapa de revisão é crítica por potencializar a contaminação microbiana e mais estudos precisam ser feitos sobre a mesma. O resfriamento foi a etapa onde os menores níveis microbianos foram encontrados nas carcaças, apesar de ser esta uma etapa de equilíbrio entre os níveis de bactérias das carcaças com as da água de resfriamento.

CAPÍTULO III - CONTAMINAÇÃO FECAL EM CARCAÇAS DE FRANGO: IMPLICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E PROCEDIMENTOS PARA A SUA REMOÇÃO

1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi relacionar a prevalência de patógenos em ambientes de criação de frangos com suas presenças no intestino dos animais e nas carcaças em diferentes condições de contaminação fecal durante o abate, bem como avaliar a eficiência de dois procedimentos para a remoção da contaminação. Os objetivos específicos foram: i) determinar a prevalência de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em lotes de frangos antes do abate, no intestino dos animais e nas carcaças com diferentes condições de contaminação fecal; ii) determinar os níveis de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* em carcaças de frango com diferentes condições de contaminação fecal; e iii) avaliar a eficiência da água em comparação com o refil para remover a contaminação fecal aparente presente em carcaças de frangos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Prevalência de *Salmonella* e *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em lotes de frangos antes do abate, no intestino dos animais e em carcaças com diferentes condições de contaminação fecal

2.1.1.1 Granjas

Visitas foram feitas a 40 granjas pertencentes ao sistema de integração de uma empresa produtora de frangos entre dez e quinze dias antes do abate dos animais. As visitas ocorreram de março a maio de 2008. As granjas estavam localizadas na região oeste do estado de Santa Catarina e continham piso de concreto ou chão batido e maravalha era usada comumente como cama dos animais.

2.1.1.2 Lotes e abatedouro

O abate dos animais foi conduzido em um abatedouro comercial localizado na região oeste do estado de Santa Catarina. O abatedouro processava frangos com aproximadamente seis (6) semanas de idade sob condições industriais típicas de abate (Figura 3) onde havia o Serviço de Inspeção Federal (SIF) e sistema de APPCC implantado, conforme requisitos do MAPA (MAPA, 2006). Os lotes correspondentes às granjas previamente analisadas foram abatidos entre maio e junho de 2008.

2.1.1.3 Coleta de amostras de cama

Dez a quinze dias antes do abate, as camas sobre as quais os lotes de frangos viviam nas granjas pré selecionadas foram amostradas pela técnica de suabe de arrasto. Este suabe consistiu em um material estéril composto de dez camadas de gazes amarradas por um cordão as quais foram umedecidas com água peptonada tamponada 0,1% (APT) (Oxoid CM 509, Basingstoke, Hampshire, UK). No momento da coleta o suabe foi arrastado sobre a superfície da cama onde os animais estavam. Após a coleta do material, o suabe de arrasto foi colocado em uma embalagem plástica estéril e transportado para o laboratório. No laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C por no máximo 2 h antes de iniciar a análise. No momento da análise, a parte externa da embalagem contendo o suabe foi higienizada com álcool 70%. Usando uma capela de fluxo laminar, 150 mL de APT 1,0% (Oxoid CM 509, Basingstoke, Hampshire, UK) foram adicionados na embalagem contendo a amostra. A amostra foi homogeneizada por 60 s em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil). Alíquotas foram então usadas para análise de

Salmonella (n = 40). Dezesete das 40 granjas amostradas foram analisadas diretamente para a determinação de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* (n = 17).

2.1.1.4 Coleta de amostras do intestino

Amostras de intestino dos animais pertencentes aos lotes de frango dos quais as camas das granjas foram previamente amostradas foram colhidas no dia do abate. Durante o abate, após a etapa de corte abdominal (Figura 3, etapa 16) e antes da etapa de evisceração, amostras do trato gastrointestinal de três animais foram colhidas de cada lote e colocadas em embalagens plástica estéril. No laboratório as amostras foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C até o momento da análise, sendo esta realizada em até duas horas após a coleta. No momento da análise, cerca de 3,3 g do conteúdo do ceco de cada uma das amostras foram pesadas (total de 10 g, n = 40) e 90 mL de APT 1,0% (Oxoid CM 509, Basingstoke, Hampshire, UK) foram adicionados à amostra. A amostra do conteúdo intestinal foi homogeneizada por 60 s em um homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil) e usada para análise de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Alíquotas foram então usadas para análise de *Salmonella* (n = 40). Dezesete das 40 granjas amostradas foram analisadas diretamente para a determinação de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* (n = 17).

2.1.1.5 Coleta de amostras de carcaças

Os mesmos lotes previamente analisados de cada uma das granjas foram também selecionados para análise das carcaças no dia do abate. Durante o abate, na etapa de revisão de carcaças (Figura 3, etapa 24), as amostras foram selecionadas e colhidas. As carcaças foram separadas em três diferentes grupos: carcaças sem contaminação fecal aparente (n = 120); carcaças com contaminação fecal aparente (n = 120); e carcaças após a remoção da contaminação fecal aparente pelo refil das parte(s) contaminada(s) (n = 120). Contaminação fecal aparente (CFA) foi definido como uma evidência macroscópica de fezes presente nas superfícies externas ou interna da carcaça. Após a coleta, todas as carcaças foram acondicionadas em embalagens plásticas estéreis individuais e transportadas para o laboratórios para a análise de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

As análises foram feitas no laboratório da indústria onde as amostras foram colhidas. No laboratório as amostras foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C até a análise, sendo esta realizada até duas horas após a coleta. No momento da análise, a parte externa de cada embalagem contendo as carcaças foi sanitizada com álcool 70%. O líquido foi friccionado com auxílio de algodão estéril para sanitizar e remover eventuais sujidades aderidas à embalagem. Em uma capela de fluxo laminar, 400 mL de APT 0,1% (Oxoid CM 509, Basingstoke, Hampshire, UK) foram adicionados em cada embalagem contendo as carcaças. O caldo da APT 0,1% foi usado para lavar a carcaça interna e externamente durante 60 s. Posteriormente, as carcaças foram removidas do caldo e este foi submetido à homogeneização durante 60 s. em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil). Alíquotas de cada amostra preparada foram tomadas para análise de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Para a análise de *Salmonella*, 30 mL do caldo de lavagem das carcaças foram incorporados a 30 mL de APT em concentração dupla. A amostra foi então homogeneizada por 60 s. e usada para a análise (FSIS, 2007).

2.1.2 Níveis de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* em carcaças de frango com diferentes condições de contaminação fecal aparente e eficiência da água em comparação com o refile para remover a contaminação

Esta avaliação foi feita em duas etapas. Uma como um teste piloto e outra em condições normais durante o abate.

2.1.2.1 Teste piloto. Carcaças de frango de 56 lotes de frangos aleatoriamente selecionados no período de maio a julho de 2008 foram avaliados. As carcaças foram separadas em três diferentes grupos e colhidas em duplicata na etapa de revisão (Figura 3, etapa 24) sendo: grupo 1 - carcaças com CFA (n = 112); 2 - carcaças após o refile da CFA (n = 112); e 3 - carcaças sem CFA (n = 112).

A cada coleta, uma das carcaça de cada grupo foi colocada imediatamente em embalagem estéril. A outra carcaça foi submetida à lavagem com água potável em chuveiro com 5 – 6 kgf/cm² de pressão na mesma condição usada na linha de abate

para a lavagem final das carcaças, antes da etapa de resfriamento (Figura 3, etapa 25). Para manter os requerimentos do plano de APPCC do abatedouro onde o estudo foi realizado este experimento foi feito no final do abate quando havia, posteriormente, higienização completa dos equipamentos e do ambiente. No momento da lavagem apenas as carcaças do teste piloto eram lavadas e após este procedimentos as mesmas eram removidas manualmente da linha de abate. Cada carcaça submetida à lavagem foi acondicionada em embalagens plástica estéril. As carcaças lavadas e não lavadas foram transportadas para o laboratório para análise.

2.1.2.2 Avaliação durante o abate. Carcaças de frango de 100 lotes aleatoriamente selecionados no período de março a junho de 2012 foram avaliados. As carcaças foram separadas em três diferentes grupos sendo as amostras do grupo 1 analisadas primeiramente e as dos grupos 2 e 3 analisadas posteriormente e de forma concomitante. As amostras do grupo 1, compostas de carcaças com CFA (n = 50) e carcaças após a remoção da CFA pelo refile (n = 50), foram colhidas na etapa de revisão (Figura 3, etapa 24) e correspondiam às condições de rotina e operação conforme exigência da Circular 668 (MAPA, 2006) para atendimento do PCC1B. Após o término da avaliação destas amostras, foi instalada uma lavadora de carcaças a qual ficou localizada após a evisceração completa das carcaças e antes da etapa de revisão (Figura 3). Após a lavadora de carcaças ter sido instalada e estar em funcionamento, foram colhidas as amostras de carcaças dos grupos 2 e 3. As carcaças do grupo 2 que correspondiam à carcaças com CFA antes de serem lavadas e carcaças com CFA após a lavagem (n = 100) e as carcaças do grupo 3, composto de carcaças sem CFA antes da lavagem e carcaças sem CFA após a lavagem (n = 100) foram colhidas para análises microbiológicas. As carcaças submetidas à lavagem foram selecionadas e identificadas antes da sua entrada na máquina, sendo os ganchos da linha onde as mesmas estavam penduradas identificados para posterior remoção. A lavagem das carcaças foi feita com água potável em chuveiro com as especificações descritas na Tabela III.1. A lavagem das carcaças selecionadas era concomitante à lavagem das demais carcaças presentes na linha de abate e que não pertenciam ao estudo.

No laboratório todas as amostras obtidas em 2.1.2.1 e 2.1.2.2 foram mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C por no máximo 2 h até o início das análises. No momento da análise, a parte externa de cada embalagem contendo as carcaças foi sanitizada com álcool 70%. O líquido foi friccionado com auxílio de algodão estéril para sanitizar e remover eventuais sujidades aderidas à embalagem. Em uma capela de fluxo laminar, 400 mL de APT 0,1% (Oxoid CM 509, Basingstoke, Hampshire, UK) foram adicionados em cada embalagem contendo as carcaças. O caldo APT 0,1% foi usado para lavar a carcaça interna e externamente durante 60 s. Posteriormente, as carcaças foram removidas do caldo e este foi submetido à homogeneização durante 60 s. em homogeneizador peristáltico (Logen, Diadema, SP, Brasil). Alíquotas de cada amostra preparada foram tomadas para análise de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*.

Tabela III. 1. Especificação da máquina de lavagem de carcaças

Requisitos	Padrão de operação
Pressão média	10 Kg força/cm ²
Volume de água	1,5 litros/carcaça
Número de bicos de lavagem	26 bicos tipo leque
Direção dos bicos externos	Distribuídos ao longo da extensão da máquina fazendo a toalete da carcaça de cima para baixo em ângulo inclinado inferior a 45°
Direção dos bicos internos	Verticais, lavando de cima para baixo e no retorno enxaguando de baixo para cima
Tempo médio de residência das carcaças	De 3 a 5 s dependendo da velocidade de abate

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Pré-Enriquecimento das amostras: as amostras preparadas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 21 ± 3 h em incubadora (Fanem 347 CD, São Paulo, SP, Brasil).

Extração do DNA: após o pré-enriquecimento, foi feita a lise celular e extração do DNA (ácido desoxirribonucleico). O reagente, solução tampão lysis + protease, foi

preparado pela adição de 150 µL de protease e 12 mL de solução tampão, ambos fornecidos prontos pela Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA). Foram adicionados nos tubos de lise 200 µL da solução tampão lysis + protease e 10 µL da amostra pré-enriquecida. Os tubos foram levados para blocos de aquecimento a 37 ± 2 °C durante 20 min. e, posteriormente, a 95 ± 3 °C por 10 min. Após as duas etapas de aquecimento, as amostras foram transferidas para o bloco de refrigeração e mantidas em geladeira por, no máximo, 48 h. As amostras foram retiradas da geladeira 5 min. antes de iniciar a etapa subsequente.

Preparo da amostra e reação nos tubos de PCR: foram adicionados aos tubos de PCR BAX® System *Salmonella*, 50 µL da solução de lise contendo DNA extraído. Os tubos de PCR foram levados para o termociclador/detector do equipamento BAX® System Q7 Du Pont Qualicon (Wilmington, DE, EUA), previamente preparado para a análise de *Salmonella*. O tempo de detecção e leitura, geralmente de três horas e trinta minutos, foi controlado e indicado pelo Sistema BAX® System Q7.

No final da etapa de reação, o resultado de cada amostra foi mostrado como positivo ou negativo, diretamente na tela do computador através do programa do equipamento BAX® System Q7. O resultado obtido como negativo no equipamento BAX® System Q7 foi considerado como negativo definitivo e o resultado obtido como positivo foi considerado positivo presuntivo.

Os resultados presuntivos positivos foram confirmados pelo método bacteriológico segundo a ISO 6579 (ISO, 2002). Aliquotas de 0,1 mL de cada amostra pré-enriquecida, mantida em geladeira em 5 ± 3 °C, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9,9 mL de meio Rappaport Vassiliadis (Merck, Darmstad, Germany) e 1 mL para 9 mL de caldo tetracionato-verde brilhante (Merck, Darmstad, Alemanha). Os tubos de meio de Rappaport Vassiliadis foram incubados a $41,5 \pm 1$ °C e de tetracionato-verde brilhante a 36 ± 1 °C por 21 ± 3 h em incubadora (Fanem 347 CD, São Paulo, SP, Brasil). Após a incubação, cada amostra enriquecida em Rappaport Vassiliadis e em tetracionato-verde brilhante foi estriada em placa contendo ágar verde brilhante (Merck, Darmstad, Alemanha) e placa contendo ágar XLT4 (Merck, Darmstad, Alemanha). Todas as placas foram incubadas por 21 ± 3 h a 36 ± 1 °C e então examinadas quanto à presença ou não de colônias suspeitas de *Salmonella*. Colônias

suspeitas de *Salmonella* foram identificadas bioquímica e sorologicamente. Testes bioquímicos incluíram a avaliação produção de urease, fermentação da glucose, sacarose e lactose em ágar três açúcares e ferro (TSI) (Merck, Darmstad, Alemanha), descarboxilação da lisina, produção de H₂S, motilidade e produção de indol. O teste sorológico foi realizado com soro polivalente O (Probac, Brazil). Os isolados de *Salmonella* foram enviados para identificação sorológica no laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro.

2.2.2 Pesquisa e contagem de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari*

A partir das amostras preparadas foram retiradas alíquotas para extração do DNA e análise bacteriológica.

Extração do DNA: foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.2.1 para a análise de *Salmonella* apenas usando 5 µL da amostra.

Preparo da amostra e reação nos tubos de PCR: foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.2.1 para a análise de *Salmonella* apenas usando os tubos de PCR BAX® System Real-Time *Campylobacter jejuni/coli/lari* e 30 µL da solução de lise contendo o DNA extraído.

As amostras foram colocadas no equipamento BAX® System para início da reação. Após, 1 h 30 min. os resultados foram mostrados para cada amostra como positivo ou negativo diretamente na tela do computador através do programa do Sistema BAX® System Q7. O resultado negativo foi considerado como negativo definitivo e o resultado positivo no BAX® System Q7 foi considerado positivo presuntivo. Quando o resultado era positivo e a quantidade de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* eram > 10⁴ UFC/g, as contagens eram obtidas diretamente do programa do BAX® System Q7.

Os resultados positivos presuntivos foram submetidos à confirmação pelo método ISO 10271-1 (ISO, 2006). Para análise bacteriológica, uma alíquota de 1 mL da amostra preparada foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Bolton (Oxoid CM 983, Basingstoke, Hampshire, UK), adicionado de suplemento contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida (Oxoid SR 183E, Basingstoke, Hampshire, UK). Os tubos foram incubados a 41,5 °C por 24 h em atmosfera de microaerofilia. Posteriormente, a cultura foi estriada na superfície de meio mCCDA

(modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar, Oxoid CM 739, Basingstoke, Hampshire, UK) contendo em sua composição suplemento seletivo (Oxoid SR 155, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas a 41,5 °C por 48 h em atmosfera de microaerofilia. Colônias típicas de *Campylobacter* em mCCDA foram confirmadas como *Campylobacter* spp por testes morfológicos, motilidade, crescimento microaerófilo a 25 °C e oxidase (ISO, 2006).

2.2.3 Contagem de *E. coli* e coliformes totais

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-2} a 10^{-5} das amostras preparadas foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6414, St. Paul, MN, EUA). As diluições necessárias foram feitas transferindo 1 mL da amostra para 9 mL de solução salina 0,85% (10^{-1}). Posteriormente, 1 mL desta diluição foi transferida para outro tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% (10^{-2}) e assim sucessivamente até obter todas as diluições necessárias. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 ± 2 h e, posteriormente, foram submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Nestas placas as colônias de *E. coli* foram caracterizadas por apresentarem coloração azul com bolhas de gás e as colônias de coliformes totais por colônias vermelhas com a presença de gás. As contagens de *E. coli* e coliformes totais foram determinadas conforme procedimento do USDA (USDA, 1998).

2.2.4 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-6} das amostras preparadas foram adicionadas na superfície de placas Petrifilm 3M (Petrifilm 6421, St. Paul, MN, EUA). As diluições necessárias foram feitas transferindo 1 mL da amostra para 9 mL de solução salina 0,85% (10^{-1}). Posteriormente, 1 mL desta diluição foi transferida para outro tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% (10^{-2}) e assim sucessivamente até obter todas as diluições necessárias. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 ± 2 h e, posteriormente, submetidas a contagem das colônias, conforme orientação do fabricante. Foram contadas como colônias de *Enterobacteriaceae* as que apresentavam coloração vermelha associadas apenas com formação de gás; colônias vermelhas associadas apenas com zonas ácidas de coloração amarela e colônias

vermelhas associadas com formação de gás e com zonas ácidas de coloração amarela, conforme orientação do fabricante. As contagens de *Enterobacteriaceae* foram determinadas conforme AOAC (2003).

2.2.5 Cálculo dos resultados das contagens de micro-organismos

Quando o procedimento dos EUA foi usado, as UFC/g foram calculadas usando a fórmula $\text{UFC/g} = (\text{UCF} \times \text{V} \times \text{D}) / \text{P}$, sendo UFC = unidades formadoras de colônias obtidas na placa, V = volume de APT usada para lavar a carcaça (400 mL), D = diluição usada na placa e P = peso da carcaça.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalências de *Salmonella* e *Campylobacter* nas granjas, nos intestinos e nas carcaças foi determinada por estatística descritiva com determinação do percentual de positividade das bactérias e seu intervalo de confiança (IC) com significância de 95%. Para as quantidades de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* encontradas nos intestinos e carcaças foram determinados a média, o desvio padrão e o valor máximo em Log UFC/mL. A média e o desvio padrão foram calculados com um valor de Log de 3,99 quando foi detectado $< 4,0$ Log UFC/mL. As contagens de cada tipo de *Campylobacter* detectado foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Para a avaliação das contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* os resultados em UFC foram transformados em Log_{10} de UFC/g. Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa estatístico XLSTAT versão 2009.5.01Addinsolft™ (New York, NY, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PREVALÊNCIA DE *SALMONELLA* E *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *C. COLI* E *C. LARI* EM LOTES DE FRANGOS ANTES DO ABATE, NO INTESTINO DOS ANIMAIS E NAS CARCAÇAS COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONTAMINAÇÃO FECAL

A presença de *Salmonella* foi detectada em 5,0% (2 em 40) das amostras de cama das granjas avaliadas neste estudo. Este baixo percentual de *Salmonella*, detectado nas granjas antes do abate, provavelmente está associado com os esforços da indústria onde o estudo foi feito para controlar *Salmonella* na cadeia de produção através das medidas de biossegurança implantadas nas granjas de criação dos animais. A prevalência de *Salmonella* encontrada nas granjas avaliadas foi similar as porcentagens e achados descritos em outros estudos e monitoramentos. Durante o ano de 2007, os estados membros da União Europeia detectaram uma positividade média de *Salmonella* de 3,7% em camas nas granjas e em 10 dos estados membros, a positividade média foi inferior a 5,0% (EFSA, 2009). FELS-KLERX et al. (2008) detectaram uma prevalência de *Salmonella* de 7,7% em lotes antes do abate. QUEIROZ et al. (2010), usando a técnica de suabe, detectaram que das 376 amostras colhidas em cama de aviários onde estavam pintos de um dia, nenhuma delas foi positiva para *Salmonella*. Níveis mais elevados de *Salmonella* em granjas também podem ser encontrados. Na Colômbia, DONADO-GODOY et al. (2012) detectaram a presença de *Salmonella* em 65% das amostras de suabe de cama de granjas de frangos.

As duas amostras positivas de *Salmonella* isoladas nas amostras de cama das granjas foram sorotipadas. Em uma dessas amostras foi identificado *S. Agona* e na outra, *S. Lexington*. *Salmonella* *Agona* foi o terceiro sorotipo mais isolado em carcaças de frango no Brasil no período de 2004 a 2010, sendo o segundo mais comum na região sul do país (BARROS DE FREITAS, 2011). Isso demonstra que *S. Agona* é comumente associada com amostras avícolas. *Salmonella* *Lexington* não tem sido

encontrada como um sorotipo de importância em carne de frangos (SCHLOSER et al., 2000; SUMMER et al., 2004; BERRANG et al., 2009; EFSA, 2009; BARROS DE FREITAS, 2011). Na Colômbia, DONADO-GODOY et al. (2012) encontraram, em amostras de cama de granjas de frangos, *S. Java* como a mais prevalente (76,4%), seguida de *S. Heidelberg* (22,7%) entre 70 granjas analisadas.

As amostras do conteúdo intestinal do ceco, bem como todas as carcaças com diferentes condições de CFA, foram todas negativas para *Salmonella*. A ausência de *Salmonella* no conteúdo intestinal indica que, provavelmente, a bactéria não estava presente nos lotes de frango no momento do abate. Isso também ocorreu com as amostras dos dois lotes de frango nos quais as camas das granjas foram positivas para *Salmonella*. Estes resultados demonstram que, lotes considerados positivos para *Salmonella*, através da análise de suabe de arrasto na cama das granjas dos animais antes do abate, nem sempre se encontra a bactéria no trato gastrointestinal dos animais ou resulta em carcaças contaminadas. Segundo RASSCHAERT et al. (2008), o status de *Salmonella* nos lotes de frangos avaliados semanas antes do abate, nem sempre está correlacionado com seu status no dia do abate. Nestes casos, o status de *Salmonella* pode ter mudado de animais excretores de *Salmonella* para aves livres da bactéria e vice-versa. De acordo com MARIN & LAINEZ (2009), o pico máximo de detecção de *Salmonella* nas fezes de aves contaminadas com a bactéria ocorre até os 14 primeiros dias de criação dos animais. Posteriormente, segundo os autores, a excreção da bactéria decresce e passa a ser intermitente até o momento do abate. Outra hipótese para explicar a detecção de *Salmonella* nos lotes antes, mas não no dia do abate, é com relação ao sorotipo de *Salmonella* detectado. Sorotipos de *Salmonella* causadores de contaminação ambiental, como a *S. Lexington* e que não são comuns na transmissão vertical em frangos, nem sempre colonizam o intestino dos animais, embora esteja presente no ambiente onde os animais vivem.

Uma baixa prevalência de *Salmonella* em intestino e em carcaças de frangos foi também detectada em outros estudos. REITER et al. (2007) encontraram *Salmonella* em 6,7% das amostras de intestino. No entanto, nas carcaças colhidas antes da etapa de resfriamento, condição similar às carcaças sem CFA e das carcaças após o refile da CFA analisadas em nosso estudo, a presença de *Salmonella* não foi detectada

(REITER et al., 2007). Entre 2003 e 2008, a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango resfriadas no Brasil foi de 6,06% (MAPA, 2010). Por outro lado, carcaças de frango contaminadas com *Salmonella* têm sido associadas com a presença da bactéria no intestino dos animais antes do abate (ARSENAULT et al., 2007; MAINALI et al., 2009). O controle de *Salmonella* ao longo da cadeia para diminuir os níveis de contaminação em frangos, onde adequadamente praticado, pode reduzir a prevalência de *Salmonella* nas carcaças (MEAD et al., 2010). Na indústria onde foi realizado este estudo, havia programas de controle de *Salmonella* implantados em todos os estágios de produção.

Tradicionalmente, tem sido estabelecido que os patógenos presentes no intestino dos animais são transmitidos para as carcaças e para a carne durante o abate (SUMMER et al., 2004). A presença de fezes em carcaças de frango é um indicador da presença de *Salmonella* de acordo com a legislação brasileira (MAPA 2006) e, por isso, foi determinado antes da etapa de resfriamento, um PCC obrigatório para todos os estabelecimentos de abate de aves para a remoção da contaminação gastrointestinal das carcaças. Entretanto, em nosso estudo, foi constatado que carcaças contaminadas com fezes não estavam contaminadas com *Salmonella* e isso foi também verificado para os dois lotes positivos detectados previamente ao abate. A baixa correlação na prevalência de *Salmonella* em lotes de animais antes do abate com as carnes também foi observado por FELS-KLERX et al. (2008). A contaminação com *Salmonella* em carcaças de frango pode variar de planta para planta (COX et al., 2010) e de região para região (EFSA, 2009; BARROS DE FREITAS, 2011) e está relacionada com o controle ao longo da cadeia de produção (MEAD et al., 2010). Nossos resultados mostram que a presença de fezes nas carcaças de frango não está associada com a presença de *Salmonella* no intestino dos animais e nas granjas onde os animais viviam antes do abate. O mais importante, entretanto, é conhecer o status de *Salmonella* dos lotes antes do abate e ter medidas preventivas durante o abate para prevenir contaminação cruzada e proteger a carne de possíveis contaminações por *Salmonella* (RASSCHAERT et al., 2008). Por outro lado, a prevenção da contaminação fecal nas carcaças deve ser uma constante preocupação das indústrias

de carne de frango por se tratar de um problema sanitário (MAPA, 1962; MAPA, 1998; MAPA, 2006).

Ao contrário dos resultados de *Salmonella*, a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* foi alta, porém *C. lari* não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas. *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foram detectados em diferentes percentuais nas amostras das camas das granjas antes do abate, no conteúdo intestinal e nas carcaças com diferentes condições de CFA (Figura III.1).

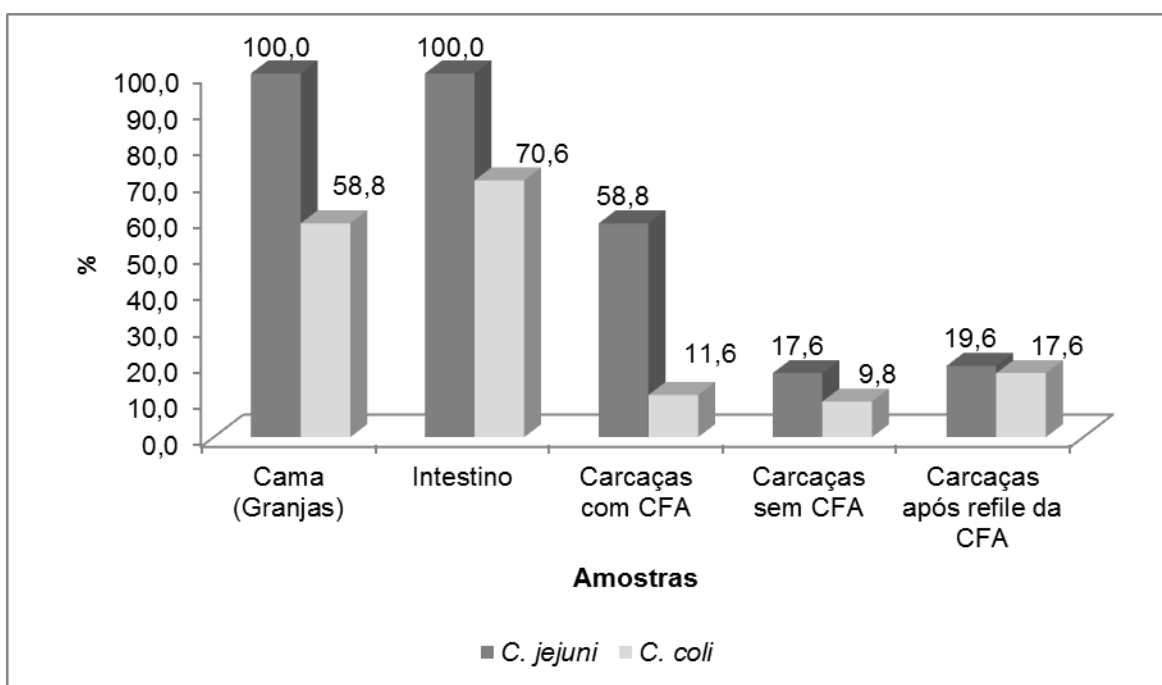


Figura III.1. Prevalência (%) de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em cama de granjas, intestino-ceco e carcaças com diferentes condições de contaminação fecal aparente.

Campylobacter jejuni foi encontrado em 100% das amostras de cama e *C. coli* em 58,8% (IC 95%, 45,3 a 72,3%) delas. Em amostras do conteúdo intestinal, *C. jejuni* também estava presente em 100% das amostras analisadas e *C. coli* em 70,6% (IC 95%, 58,1 a 83,1). Em 12 das 17 amostras analisadas, *C. jejuni* e *C. coli* estavam presentes na mesma amostra.

A presença de fezes mostrou ser uma importante fonte de contaminação de *C. jejuni* e *C. coli* nas carcaças. Nas carcaças que continham CFA, *C. jejuni* foi detectado

em 58,8% (IC 95%, 45,3 a 72,3%) das amostras e *C. coli* em 11,6% (IC 95%, 2,8 a 20,4%). Nas carcaças sem CFA, a prevalência de *C. jejuni* foi de 17,6% (IC 95%, 7,2 a 28,0) e de *C. coli* foi de 9,8% (IC 95%, 1,7 a 17,9%). Por outro lado, nas amostras após o refil da CFA a presença de *C. jejuni* foi semelhante ao das carcaças sem CFA, sendo que *C. jejuni* apresentou uma prevalência de 19,6% (IC 95%, 8,8 a 30,4%) e *C. coli* de 17,6% (IC 95%, 7,2 a 28,0%).

A prevalência de *Campylobacter* da granja ao abate de frangos varia entre os diferentes estudos realizados e geralmente é elevada (BERNDTSON et al., 1996; REITER et al., 2005; RODRIGO et al., 2005; CHRYSTAL et al., 2008; KING & ADAMS, 2007; KUANA et al., 2008; DALLAL et al., 2010; EFSA 2010b; MAREMÃE et al., 2010; SAMPERS et al., 2010). A contaminação com *Campylobacter* varia significativamente entre diferentes países e entre diferentes abatedouros e, geralmente, a contaminação de lotes de frangos por *Campylobacter* começa na granja e durante o abate esta contaminação aumenta (EFSA, 2010b).

KUANA et al. (2007) encontraram 81,8% dos lotes de frangos antes do abate positivos para *Campylobacter* spp. REITER et al. (2005) detectaram *Campylobacter* spp. em 63,3% das amostras de intestino de frangos e ARSENAULT et al. (2007) encontraram 52% de amostras de intestino-ceco positivas para *Campylobacter* spp. Por outro lado, uma baixa porcentagem (6,3%) em material de intestino-ceco de frangos foram positivas para *Campylobacter* spp, entre 2005 a 2007 na Estônia (MAREMÃE et al., 2010).

A detecção de 100% das camas das granjas com *C. jejuni* antes do abate e também com a mesma porcentagem de positividade no conteúdo cecal dos frangos confirma que a disseminação de *Campylobacter* spp. entre os animais de um mesmo lote é elevada (BERNDTSON et al., 1996; RASSCHAERT, et al., 2007). Essa disseminação pode ser afetada pelo contato entre os animais de um mesmo lote com fezes contaminadas. CORTEZ et al. (2006) encontraram *Campylobacter* em 22,2% das amostras de fezes analisadas, em 5,6% das amostras de pena, em 5,6% das carcaças após evisceração e em 2,8% das amostras após a escaldagem e em 2,9% das amostras de água de evisceração.

Neste estudo, as carcaças foram colhidas na etapa de revisão, antes do resfriamento. Como esperado, carcaças com CFA foram as que apresentaram maior contaminação com *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. Isso demonstra que a presença de fezes resulta em uma porcentagem maior de carcaças contaminadas com *Campylobacter*, mas não em 100% delas. Este fato pode ser explicado pelo estudo de WOLDEMARIAM et al. (2008), no qual os autores observaram que nas análises do material contido no ceco dos frangos foi encontrado maior prevalência da *Campylobacter* quando comparado com amostras de fezes colhidas imediatamente após a excreção.

Por outro lado, carcaças de frango após a remoção da CFA pelo refil mostraram uma diminuição na presença de *C. jejuni* (58,8 para 19,6%) mas um aumento na prevalência de *C. coli* (11,6 para 17,6%) quando comparado com carcaças sem CFA. Provavelmente, este aumento na contaminação por *C. coli* pode estar associado com a manipulação das carcaças para a remoção da CFA. Por outro lado, as carcaças sem CFA, analisadas neste estudo, também apresentaram contaminação com *C. jejuni* e *C. coli*. Estes resultados mostraram que a contaminação por *Campylobacter* pode ocorrer também por outras vias que não apenas pela presença de fezes nas carcaças. Contaminação cruzada durante o abate pode ocorrer, resultando em carcaças contaminadas (EFSA, 2010b). Em carcaças antes do resfriamento, comparado com carcaças sem CFA analisadas neste estudo, REITER et al. (2005) detectaram *Campylobacter* spp. em 16,7% das amostras testadas, resultado similar aos 17,6% de *C. jejuni* encontrado em nosso estudo.

Nas amostras de intestino positivas, os níveis de *C. jejuni* variaram de < 4,0 a 7,20 Log UFC/g com uma média de $5,46 \pm 0,99$ Log UFC/g. Nestas amostras, os níveis de *C. coli* foram maiores e variaram de 5,70 até 8,98 Log UFC/g com uma média de $7,95 \pm 0,98$ Log UFC/g.

Com relação as contagens de *Campylobacter* nas amostras de carcaças positivas, os resultados estão apresentados na Tabela III.2. Estes mostraram não haver diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey, $p \geq 0,05$) entre as carcaças com diferentes condições de CFA. A média das contagens de *C. jejuni* nas carcaças com CFA foi de $4,67 \pm 0,57$ Log UFC/g e a média das contagens de *C. coli* foi de $5,46 \pm$

0,92 Log UFC/g (Tabela III.2). Em relação as carcaças após o refil das partes com CFA, todas as amostras testadas continham menos do que 4,0 Log UFC/g de *C. jejuni*. Nestas carcaças, o nível médio de *C. coli* foi maior ($5,07 \pm 0,67$ Log UFC/g). Carcaças sem CFA apresentaram uma média de $4,66 \pm 0,23$ e $4,96 \pm 0,75$ UFC/g para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente (Tabela III.2).

Tabela III.2. Níveis de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças com diferentes condições de contaminação fecal aparente

Carcaças	Log ₁₀ UFC/mL					
	<i>C. jejuni</i>			<i>C. coli</i>		
	Média ^x	DP ^x	Máximo	Média ^x	DP ^x	Máximo
Com CFA	4,67	0,57	5,63	5,46	0,92	6,49
Após refil da CFA	3,99	0,00	3,99	5,07	0,67	5,90
Sem CFA	4,66	0,23	4,88	4,96	0,76	6,30

CFA = contaminação fecal aparente ^x Os resultados de média e desvio padrão (DP) foram calculados com um valor de Log de 3,99 para carcaças quando o valor de contagem de < 4,0 Log UFC/mL foi encontrado.

Nas amostras analisadas, foi observado que os níveis médios de *C. coli* foram maiores do que os de *C. jejuni* (Tabela III.2), apesar da prevalência de *C. coli* ter sido menor em relação a *C. jejuni* (Figura III.1). CHRYSTAL et al. (2008) encontraram uma média de 3,60 Log UFC/carcaça para amostras positivas em estudo realizado com sete plantas processadoras de frangos. Durante o ano de 2008, amostras de carcaça de frango analisadas pelos países membros da União Europeia mostraram que quase a metade (47,0%) das amostras analisadas continham menos do que 10 UFC/g de *Campylobacter* e apenas 5,8% continham mais do que 4,0 Log UFC/g (EFSA, 2010b). No geral, foi observada a tendência de se encontrar altas contagens em países com alta prevalência de *Campylobacter* (EFSA, 2010b). BERRANG et al. (2009) constataram que, em carcaças resfriadas, a quantidade de *Campylobacter* encontrada foi de $1,81 \pm 0,27$ Log UFC/mL. Na Austrália, KING & ADAMS (2007) encontraram níveis de *Campylobacter* de 163 UFC/cm² na superfície de carcaças de frango com uma variação de 5 a 1.850 UFC/cm². BERRANG et al. (2009) avaliaram a quantidade de *Campylobacter* em carcaças antes do resfriamento em 20 abatedouros dos EUA e constataram que as contagens média variaram de 0,78 a 4,49 Log UFC/mL com média de 2,66 Log UFC/mL.

A EFSA recomenda que os programas de controle de *Campylobacter* sejam baseados em uma abordagem integrada entre a granja e o abatedouro (EFSA, 2010b). Lotes de frango contaminados com *Campylobacter* possuem 30 vezes mais probabilidade de resultar em carcaças contaminadas com alta prevalência e altas contagens de *Campylobacter* (EFSA, 2010b). Durante o abate de lotes positivos, *Campylobacter* se espalha no ambiente, equipamentos e água utilizados no processo de abate. Para BERNDTSON et al. (1996), para diminuir a contaminação por *Campylobacter* durante a fase de abate, o processo usado atualmente precisa ser totalmente modificado, com redução da contaminação fecal das carcaças e equipamentos. Segundo os autores, o uso excessivo de água durante o abate de frangos espalha e mantém a bactéria em melhores condições de sobrevivência e este fator é visto como o mais importante e relevante para diminuir a entrada e disseminação de *Campylobacter* proveniente da granja.

A identificação de *Campylobacter* em nível de espécie mostrou que *C. jejuni* foi a espécie mais comumente isolada das amostras positivas (66,4%) seguido de *C. coli* (33,6%). Outros estudos têm mostrado resultados similares, nos quais, *C. jejuni* é a espécie mais frequentemente isolada entre as espécies de *Campylobacter* (KING & ADAMS, 2007; MORAN et al., 2009; PEPE et al., 2009; MARAMÃE et al., 2010). Na União Europeia, *C. jejuni* também tem sido a espécie mais encontrada em lotes de frangos com a presença em 60,8% das amostras positivas em 2008, seguido de *C. coli* com 41,5% e *C. lari* com 0,2%. Em carcaças de frango, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* foram encontradas em 67,9%; 39,4% e 0,3%, respectivamente, nas amostras positivas em 2008 (EFSA, 2010b). Na Austrália, KING & ADAMS (2007) encontraram 84,1% das amostras positivas como *C. jejuni* e 9,6% de outras espécies.

Em resumo, os resultados encontrados neste estudo mostram que *C. jejuni* e *C. coli* estão presentes em alta prevalência nas granjas e no conteúdo intestinal dos animais. Durante o abate, a contaminação aumenta pelas condições do processo, pela manipulação das carcaças ou por outras vias. Outro fator relevante é que não há correlação entre a prevalência de *Campylobacter* com a prevalência de *Salmonella*. As mesmas medidas que são eficientes para controlar *Salmonella* ao longo da cadeia de produção de frango de corte parecem não ser efetivas para controlar *Campylobacter*.

3.2 NÍVEIS DE *E. COLI*, COLIFORMES TOTAIS E ENTEROBACTERIACEAE EM CARÇAÇAS DE FRANGO COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONTAMINAÇÃO FECAL APARENTE E EFICIÊNCIA DA ÁGUA EM COMPARAÇÃO COM O REFILE PARA REMOVER A CONTAMINAÇÃO

A presença de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* foi detectada em 100% das amostras de carcaças de frango analisadas através da técnica de contagem de UFC/g. Os resultados das contagens encontrados nas carcaças de frango em diferentes condições de CFA, colhidas antes do resfriamento, são mostradas na Tabela III.3. Não foi observado diferença significativa nas contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* encontradas nas diferentes carcaças analisadas (teste de Tukey, $p > 0,05$). As carcaças com CFA apresentaram contagem média de *E. coli* de $5,00 \pm 0,63$ Log UFC/g, contagem de coliformes totais de $5,24 \pm 0,58$ Log UFC/g e contagens de *Enterobacteriaceae* de $5,14 \pm 0,79$ Log UFC/g. Nas carcaças com CFA submetidas ao refile da(s) parte(s) contaminada(s), a média de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* foram similares - $4,82 \pm 0,49$; $5,15 \pm 0,51$; e $5,13 \pm 0,55$ Log UFC/g, respectivamente. As carcaças sem CFA mostraram uma média de $4,73 \pm 0,75$ Log UFC/g de *E. coli*, $5,18 \pm 0,62$ Log UFC/g de coliformes totais e $5,27 \pm 0,59$ Log UFC/g de *Enterobacteriaceae*.

Baseado nos resultados obtidos, a presença de CFA nas carcaças não afetou significativamente as contagens de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* entre os três diferentes grupos de carcaças analisados. No entanto, a Portaria N° 210 do MAPA, em seu anexo IX, define os destinos e critérios de julgamento das aves, sendo passíveis de condenações as carcaças na inspeção *pos-mortem* com contaminações (MAPA, 1998). Segundo o Artigo 165 do RIISPOA, as carcaças que se contaminarem com fezes durante a evisceração ou, em qualquer outra fase do abate, devem ser condenadas (MAPA, 1952). A preocupação com o controle da contaminação fecal nas carcaças de frango esta relacionada com a presença de patógenos entéricos, o que é

um problema para as indústrias, agências reguladoras e consumidores (MAPA, 2006; MAINALI et al., 2009).

Tabela III.3. Contagem de *E. coli* (EC), coliformes totais (CT) e *Enterobacteriaceae* (EB) em carcaças de frango com diferentes condições de contaminação fecal aparente

Carcaças	Média ± desvio padrão de Log ₁₀ UFC/g		
	<i>E. coli</i>	Coliformes totais	<i>Enterobacteriaceae</i>
Com CFA	5,00 ± 0,63	5,24 ± 0,58	5,14 ± 0,79
Após refile da CFA	4,82 ± 0,49	5,15 ± 0,51	5,13 ± 0,55
Sem CFA	4,73 ± 0,75	5,18 ± 0,62	5,27 ± 0,59

CFA = contaminação fecal aparente.

Em estudo realizado por GIOTTO (2008) em um abatedouro de frangos do sul do Brasil, foi detectado que 2,80% das carcaças eram condenadas parcialmente em decorrência de algum tipo de contaminação. Segundo o autor, a contaminação das carcaças foi a segunda maior causa da condenação total e a primeira entre as causas de condenação parcial. NASCIMENTO et al. (2012) encontraram níveis de contaminação fecal em carcaças de frango que variaram de 0,1 a 1,3%. No entanto, outros tipos de contaminações também podem ocorrer em carcaças de frango como contaminações gástrica e biliar. Para SILVA (2004), as contaminações constituem uma das principais perdas de carcaças de frangos por causas não patológicas. As carcaças de frangos podem ser contaminadas com o conteúdo gastrointestinal durante o processo de abate.

A abertura da cavidade abdominal e a retirada das vísceras durante o abate de aves é uma das etapas onde ocorre o maior número de contaminações e neste caso, pelas fezes. Porém, segundo HERENDA e FRANCO (1996), durante todo o abate também pode ocorrer contaminação decorrente do extravasamento de conteúdo do papo, a qual é tão grave quanto à contaminação fecal.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com outros relatos científicos, apesar de diferenças nas metodologias aplicadas aos estudos (BLANKENSHIP et al., 1975; BILGILI et al., 2002; CASON et al., 2004; SMITH et al., 2005; FRANCHIN et al., 2007). BILGIL et al. (2002) não encontraram evidências de que a presença de conteúdo digestivo em carcaças de frango antes do resfriamento esteja associada com

a diminuição da qualidade microbiológica das carcaças após o resfriamento. CASON et al. (2004) também não encontraram evidências de que o número médio de *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e coliformes totais em carcaças após o resfriamento pudesse ser afetado pela contaminação fecal causada durante o abate em etapas anteriores ao resfriamento. Estes autores constataram que a contaminação fecal das carcaças antes do resfriamento não afeta sua qualidade microbiológica após o resfriamento. SMITH et al. (2005) observaram que não houve diferenças nas contagens de coliformes e *E. coli* em carcaças contaminadas com fezes antes do resfriamento comparadas com as carcaças após o resfriamento. FRANCHIN et al. (2007) compararam a influência do refile em carcaças com contaminação fecal e observaram que a remoção da mesma, através deste procedimento, não é o único capaz de eliminar eficazmente este tipo de contaminação em carcaças de frango.

Na tabela III.4 estão apresentados os resultados do estudo piloto comparando o refile das partes contaminadas das carcaças com o procedimento de lavagem com água potável para remover a CFA. Os resultados das contagens nas carcaças dos diferentes grupos testados (com CFA, após o refile da CFA e sem CFA) submetidas a lavagem em água potável, mostraram níveis menores de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae* quando comparado com carcaças nas mesmas condições de contaminação mas não lavadas. Diferenças significativas foram observadas nas contagens antes e após a lavagem dos diferentes grupos de carcaças analisadas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

O uso de água para remover contaminação em carcaças de frango bem como reduzir os níveis microbianos tem sido motivo de muitos estudos ao longo dos últimos anos (BLANKENSHIP et al., 1975; BILGILI et al., 2002; CASON et al., 2004; FRANCHIN et al., 2007). Por isso, o uso desta prática é permitida por lei há vários anos em países como EUA (FSIS, 2011), União Europeia (EC, 2004), Canadá (CFIA, 2010). No Brasil, este procedimento foi autorizado recentemente (MAPA, 2011b) e tem sido utilizado por grande partes das indústrias de abate de aves.

BLANKENSHIP et al. (1975) conduziram um estudo para comparar carcaças não condenadas pela presença de fezes com carcaças contaminadas e lavadas. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que não havia diferença significativa

entre as contagens de aeróbios mesófilos e *Enterobacteriaceae* das carcaças não condenadas, condenadas, condenadas pela presença de fezes e condenadas mas lavadas. NOTERMANS et al. (1980) observaram que um importante ponto para controlar a contaminação microbiológica de carcaças de frango durante o abate é a lavagem imediata das mesmas. Desta forma, segundo os autores, o uso de chuveiros para lavagem das carcaças devem estar em pontos da linha de abate onde as contaminações são mais prováveis de ocorrer.

Tabela III.4. Contagem de *E. coli* (EC), coliformes totais (CT) e *Enterobacteriaceae* (EB) em carcaças de frango com contaminação fecal aparente, após o refile da contaminação fecal aparente e sem contaminação fecal aparente antes e após a lavagem com água em chuveiro com 5-6 kgf/cm² de pressão – teste piloto

Carcaças	Média ± desvio padrão de Log ₁₀ UFC/g		
	EC	CT	EB
Com CFA antes de lavar	5,00 ± 0,63 ^a	5,24 ± 0,58 ^a	5,14 ± 0,79 ^a
Com CFA depois de lavar	3,96 ± 0,83 ^b	4,32 ± 0,63 ^b	4,26 ± 0,61 ^b
Após refile da CFA antes de lavar	4,82 ± 0,49 ^a	5,15 ± 0,51 ^a	5,13 ± 0,55 ^a
Após refile da CFA depois de lavar	4,04 ± 0,67 ^b	4,45 ± 0,72 ^b	4,52 ± 0,62 ^b
Sem CFA antes de lavar	4,73 ± 0,75 ^a	5,18 ± 0,62 ^a	5,27 ± 0,59 ^a
Sem CFA depois de lavar	3,74 ± 1,08 ^b	4,34 ± 0,68 ^b	4,37 ± 0,69 ^b

^{a, b} Médias em uma mesma coluna seguidas de diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05\%$) baseado no teste de Tukey.

BERRANG & BAILLEY (2009) observaram que o uso de lavagens sucessivas das carcaças ao longo da linha de abate tem benefício sobre a redução nos níveis de *E. coli*, porém, segundo os autores, estes benefícios não são observados quando estas mesmas lavagens são feitas de forma individual. Em uma revisão bibliográfica sobre intervenções com água durante as diferentes etapas de abate de frangos para reduzir a contaminação microbiana em carcaças de frango, FRANCHIN et al. (2010) concluíram que a lavagem combinada com outros controles permitem um eficiente e confiável controle microbiológico nas mesmas.

No Brasil, a contaminação gastrointestinal em carcaças de frango é um PCC obrigatório para todos os abatedouros de aves (MAPA, 2006). Com isso, após a evisceração completa e antes do resfriamento, todas as carcaças devem passar por uma etapa de revisão (PC) antes de serem verificadas no PCC. A etapa de revisão

consiste em um local onde funcionários treinados observam interna e externamente 100% das carcaças completamente evisceradas. Caso seja identificado visualmente a presença de contaminação gastrointestinal e/ou biliar nas carcaças, estas contaminações devem ser retiradas (MAPA, 2006). Até outubro de 2011 a contaminação gastrointestinal e/ou biliar nas carcaças de frangos devia ser removida apenas pelo refile, sendo este um procedimento orientativo do MAPA. Outra intervenção para esta finalidade, como por exemplo a lavagem das carcaças com água potável, não era permitido, apesar de nada contrário estar previsto nas leis pertinentes ao abate de frangos (MAPA, 1952; MAPA, 1998; MAPA, 2006).

Em 2008 a UBABEF solicitou ao DIPOA a substituição do sistema de refile de carcaças pelo procedimento de lavagem com a finalidade de remoção da contaminação gastrointestinal visível antes da etapa de pré-resfriamento. Posteriormente, a UBABEF apresentou ao DIPOA uma série de informações de testes referente ao assunto (MAPA, 2011a). Os resultados deste estudo piloto foram apresentados na ocasião como parte do argumento para uso da lavagem como alternativa ao refile da CFA.

Em 2011 o MAPA publicou a Resolução 4, na qual foi permitido o uso de lavagem com água potável como alternativa ao refile para a remoção de CFA. De acordo com esta resolução, as empresas interessadas em adotar este procedimento devem apresentar ao MAPA o protocolo com todos os parâmetros mensuráveis relacionados ao processo de lavagem de forma a comprovar os requisitos requeridos (MAPA, 2011b).

Desta forma, após a publicação da Resolução 4 (MAPA, 2011b) um estudo foi conduzido para avaliar, em condições normais de abate, o efeito da lavagem para remover a CFA em comparação com o refile em relação aos níveis de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*. Os resultados deste estudo são mostrados na Tabela III.5.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as carcaças com CFA e as que a CFA foi removida pelo refile manual e que representam as condições previstas na Circular 668 (MAPA, 2006), bem como as orientações do MAPA são significativamente similares (teste de Tukey, $p \geq 0,05$) em relação aos níveis de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*. Nos demais tipos de carcaças avaliadas, os resultados mostraram

que a lavagem com água diminuiu os níveis microbianos dos micro-organismos indicadores de qualidade e higiene, sendo em alguns casos com diferenças significativas e em outros não (Tabela III.5).

Tabela III.5. Contagem de *E. coli* (EC), coliformes totais (CT) e *Enterobacteriaceae* (EB) em carcaças de frango com contaminação fecal aparente, após o refil da contaminação fecal aparente e sem contaminação fecal aparente antes e após a lavagem com água em chuveiro com 10 kgf/cm² de pressão durante o processo

Carcaças	Média ± desvio padrão de Log ₁₀ UFC/g		
	EC	CT	EB
Com CFA	4,85 ± 1,11 ^a	5,29 ± 0,93 ^a	5,88 ± 0,95 ^a
Após corte da CFA	4,53 ± 1,09 ^{a, b}	5,09 ± 0,96 ^{a, b}	5,79 ± 0,82 ^a
Com CFA antes de lavar	4,85 ± 0,67 ^a	4,94 ± 0,63 ^{a, b}	5,20 ± 0,72 ^b
Com CFA depois de lavar	4,29 ± 0,68 ^b	4,43 ± 0,64 ^{c, d}	4,75 ± 0,66 ^{c, d}
Sem CFA antes de lavar	4,68 ± 0,49 ^{a, b}	4,75 ± 0,45 ^{b, c}	5,08 ± 0,70 ^{b, c}
Sem CFA depois de lavar	4,25 ± 0,62 ^b	4,34 ± 0,59 ^d	4,63 ± 0,65 ^d

CFA = contaminação fecal aparente

a, b, c, d Médias em uma mesma coluna seguidas de diferentes letras são estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05\%$) baseado no teste de Tukey.

Atualmente, a lavagem de carcaças com água é uma alternativa para a remoção de contaminação CFA em carcaças de frango no Brasil (MAPA, 2011b). De acordo com FRANCHIN et al. (2007), o procedimento de lavagem não requer mão de obra adicional e diminui a possibilidade de contaminação cruzada pelos utensílios e mãos dos manipuladores. Segundo BILGILI et al. (2002), não há base científica para usar a presença de conteúdo digestivo em carcaças de frango como um padrão de avaliação do desempenho do processo de abate. A prevenção da contaminação do trato digestivo das aves deve ser uma importante meta durante o abate dos animais mas sua presença não tem valor preditivo para a qualidade microbiológica das carcaças BILGIL et al. (2002).

4 CONCLUSÕES

A prevalência de *Salmonella* foi baixa e sua presença nas camas onde os animais vivem, antes do abate não foi relacionada com a sua presença no intestino dos frangos

e nas carcaças após o abate, mesmo naquelas que sofreram contaminação fecal aparente. Por outro lado, a prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foi elevada nas camas das granjas e no intestino dos animais, bem como nas carcaças com contaminação fecal aparente. Nas carcaças após o refile da contaminação e naquelas sem contaminação fecal, a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* diminuiu. Uma prevalência mais elevada de *C. jejuni* em comparação com *C. coli* foi observada nas amostras, mas os níveis de *C. coli* foram maiores quando comparados com os de *C. jejuni*. No geral, as medidas durante a criação dos animais, bem como durante o abate que parecem ser eficientes para controlar a presença de *Salmonella*, não possuem o mesmo efeito para controlar *C. jejuni* e *C. coli*. Os estudos em escala piloto e em condições normais de abate para comparar a lavagem com água em comparação com o refile para remover a contaminação fecal aparente das carcaças de frango mostraram que a lavagem é uma alternativa viável para remover a contaminação aparente e também para diminuir os níveis de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*.

CAPÍTULO IV - COMPARAÇÃO DE QUATRO TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE *SALMONELLA*

1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes técnicas para identificar e diferenciar isolados de *Salmonella* spp. Os objetivos específicos foram: i) usar a técnica sorológica clássica, bioquímica automatizada com sistema VITEK 2™ (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), espectrometria de massas e um sistema de biologia molecular baseado em ribotipagem (Riboprinter®, DuPont Qualicon, Wilmington, DE, EUA) para identificação de isolados de *Salmonella*; e ii) avaliar o poder discriminatório de uma das técnicas utilizadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Isolados de *Salmonella*

Para comparar as diferentes técnicas foram utilizados 35 isolados de *Salmonella* previamente detectados e identificados conforme metodologia ISO 6579 (ISO, 2002) e mantidas em ágar nutriente (Merck, Darmstad, Alemanha) entre 2 e 8 °C. Os isolados foram obtidos de amostras positivas de *Salmonella* previamente analisadas em outros capítulos desta tese e também de outras amostras de origem avícolas para obter uma maior variabilidade entre os isolados. As amostras foram identificadas de 1 a 35. A distribuição dos isolados esta apresentada na Tabela IV.1.

Tabela IV.1. Isolados de *Salmonella* utilizados na comparação das diferentes técnicas de identificação da bactéria

Sorotipos	No. de isolados
S. Saintpaul	2
S. Muenchen	1
S. Mbandaka	2
S. Newport	2
S. Infantis	2
S. Senftenberg	2
S. Enteritidis	24
Total	35

2.2 MÉTODOS

Os isolados de *Salmonella* foram submetidos aos seguintes testes de identificação: sorologia clássica, bioquímica automatizada com sistema VITEK 2TM (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) espectrometria de massas - MALDI-TOF Bio Typer (Bruker Daltonik GmbHTH) e análise genética através de ribotipagem com sistema de caracterização microbiana Riboprinter[®] (DuPont Qualicon, Wilmington, DE, EUA).

2.2.1 Identificação sorológica clássica

A identificação sorológica dos isolados foi feita pelo laboratório de referência em Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As amostras foram enviadas ao laboratório em ágar nutriente inclinado (Merck, Darmstad, Alemanha) e a identificação sorológica foi feita de acordo com os procedimentos do laboratório, seguindo os critérios de identificação propostos por GRIMONT & WEILL (2007).

2.2.2 Identificação bioquímica com sistema automatizado

A identificação bioquímica dos isolados de *Salmonella* foi feita com sistema VITEK 2TM (Figura IV.1) do laboratório de biologia molecular do SENAI, Chapecó, SC. Os isolados de *Salmonella* foram preparados conforme orientação do fabricante do sistema (BIOMÉRIEUX, 2008). Os isolados foram estriados em ágar verde brilhante

(Merck, Darmstad, Alemanha) e, posteriormente, incubados a temperatura de 36 ± 1 °C por não mais do que 24 h e observado a pureza das culturas. As culturas puras foram usadas para preparar uma suspensão com solução salina até obter uma turbidez de 0,5 a 0,63 em decímetro Densicheck® (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França).



Figura IV.1. Equipamento VITEK 2TM (bioMérieux).

Fonte: www.bioMérieux.com.br.

Para a identificação dos isolados pelo sistema VITEK 2TM foram utilizados os cartões de identificação de Gram negativos (GN Test Kit VTK 2TM), conforme instruções do fabricante (bioMérieux SA., Marcy-l'Etoile, França). Cada cartão GN Test Kit VTK 2TM continha 64 testes com substratos liofilizados para reação (Figura IV.2).

Os cartões GN Test Kit VTK 2TM foram automaticamente inoculados com a suspensão da cultura preparada por um sistema a vácuo do próprio equipamento e inseridos no módulo de incubação e leitura. Cada cartão foi submetido a uma medida cinética fluorescente a cada 15 min de incubação até o sistema ter condições de identificar a reação do teste, o que geralmente ocorreu em até 6 h.

Os resultados foram registrados pelo sistema computadorizado do próprio equipamento sendo que, ao final da análise o mesmo emitiu um relatório com os resultados dos 64 testes bioquímicos, discriminando o gênero e espécie do micro-organismo identificado, o percentual de probabilidade na identificação, o tempo de análise e, quando necessário, foram recomendadas avaliações adicionais. O percentual de similaridade com o padrão foi definido pelo sistema VITEK 2TM de acordo

com o seguinte critério: excelente de 96 a 99%; muito bom de 93 a 95%; bom de 89 a 92%; aceitável de 85 a 88%; e baixa discriminação ou micro-organismo não identificado quando o percentual foi inferior a 85%.

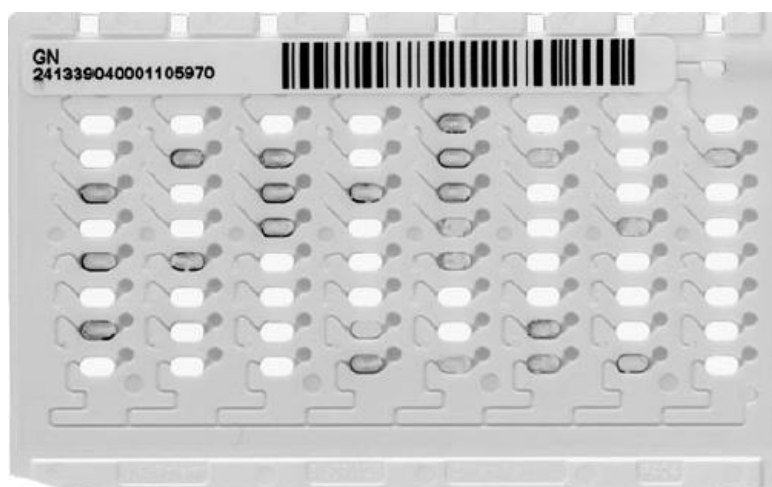


Figura IV.2. Cartão usado sistema VITEK 2™ para a identificação de *Salmonella*.

Fonte: WWW.pda.org/bookstore.

2.2.3 Identificação por espectrometria de massas

2.2.3.1 Preparo das culturas para análise

A identificação dos isolados de *Salmonella* por espectrometria de massas foi feita no laboratório de Biofísica do Instituto de Farmácia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em São Paulo. O procedimento de preparo das culturas foi feito conforme a orientação do fabricante do equipamento de espectrometria de massas (BRUKER DALTONIK, 2008) com modificações. As culturas de *Salmonella* foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Merck, Darmstad, Alemanha) e incubados a 36 ± 1 °C por não mais do que 18 h. Posteriormente, 700 µL de cada cultura foram transferidos para micro tubo de centrifugação tipo Eppendorf e centrifugados por 2 min. a 11.000 g, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, 300 µL de água destilada estéril foram adicionados ao tubo contendo a cultura. O material foi agitado em vortex até a completa resuspensão das células

bacteriana. Em seguida, 900 µL de etanol p.a. (Merck, Darmstad, Alemanha) foram adicionados no tubo e agitado em vortex cuidadosamente. O tubo contendo a solução foi centrifugado por 2 min. a 11.000 g e em seguida, o sobrenadante foi descartado, tomando o cuidado para as células permanecerem no tubo. O tubo foi colocado sobre papel dentro de câmara de fluxo laminar até a secagem completa da sua parte interna. Quando a secagem foi completada, 50 µL de ácido fórmico (JTBaker, México, México) em solução a 70% foram adicionados no tubo e as células resuspensas com agitação em vortex o mais rápido possível. Em seguida, 50 µL de acetonitrila (Merck, Darmstad, Alemanha) pura foram adicionados ao tubo e então o mesmo foi homogeneizado. O tubo contendo o material foi então centrifugado por 2 min. a 11.000 g. O material foi mantido sob congelamento a -18 °C até o momento da análise.

2.2.3.2 Análise

As análises das culturas preparadas foram feitas no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em São Paulo. O procedimento de preparo das amostras para análise foi seguido conforme a orientação do fabricante do equipamento (BRUKER DALTONIK, 2008). No dia da análise o material foi retirado do congelador e mantido em temperatura ambiente (18 a 25 °C) por aproximadamente 30 min. O tubo contendo a amostra foi então centrifugado por 2 min. a 11.000 g. Sobre uma placa de MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, # 224990) limpa e seca foi adicionado em triplicata 1 µL do sobrenadante de cada amostra preparada. A placa foi deixada em temperatura ambiente até a completa secagem do material. Após a secagem completa foi adicionado sobre cada uma das amostras 1 µL de solução de matriz e a placa permaneceu em temperatura ambiente até a completa secagem (Figura IV.3)

A placa de MALDI-TOF foi colocada no compartimento do equipamento (Figura IV.4) de espectrometria de massas Bruker Daltonik Microflex LT (Figura IV.5) para a análise e identificação bacteriana. As medições foram realizadas usando o software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics) de acordo com as configurações usadas por LEUSCHMER et al. (2003). Os espectros foram registrados no modo positivo linear (frequência de laser, 20 Hz; com voltagem da fonte de íons 1 de 20 kV e da fonte de

íons 2 de 18,6 kV; voltagem da lente de 7,5 kV; faixa de massa, de 2000 a 20 000 Da).



Figura IV.3. Placa MALDI-TOF contendo amostra e matriz.

Fonte: Laboratório de Biofísica UNIFESP.

Para cada espectro, 240 tiros em etapas de 50 tiros de diferentes posições do ponto de destino (modo automático) foram colhidos e analisados. Os espectros foram internamente calibrados usando proteínas ribossomais de *Escherichia coli* (DH5alpha) que apresentam um pico de 10299,09 Da foi usada, conforme orientação do fabricante (BRUKER DALTONIK, 2008). Os espectros obtidos foram importados para o software Biotyper (versão 2.0, Bruker Daltonics) e processados com modelo combinando com configurações padrão, e os resultados reportados na tabela de classificação. Resultados do processo de correspondência de padrão foram expressos como proposto pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF (MT) com pontuações variando de 0 a 3. Scores com pontuação de 1,70 foram consideradas não ter uma identificação confiável; uma pontuação de 1,7 a 1,9 foi considerada com boa identificação do gênero e uma pontuação maior do que 1,9 foi considerada como identificação de espécie confiável.

2.2.3.3 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Toda a água utilizada foi ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Solução de matriz

Cristais de α -HCCA (cyano-4-hidroxyl ciano ácido) (Bruker Daltonik GmbH, #201344) foram transferidos para um tubo tipo Eppendorf e posteriormente, adicionado

200 μ L de uma solução composta de 50% de acetonitrila (Merck, Darmstad, Alemanha) e 2,5% de ácido tricloroacético. A solução foi misturada em vortex por 1 min e mantida em temperatura ambiente (18 – 25 °C) até a solução se tornar saturada (BRUKER DALTONIK, 2008).

Solução de ácido fórmico 70%

Um volume de 70 mL de ácido fórmico (Merck, Darmstad, Alemanha) foi adicionado cuidadosamente a 30 mL de água ultra pura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). A solução foi homogeneizada cuidadosamente e acondicionada em frasco âmbar (BRUKER DALTONIK, 2008).



Figura IV.4. Placa MALDI-TOF no compartimento do equipamento de espectrometria de massas Bruker Daltonik Microflex LT.

Fonte: Laboratório de Biofísica UNIFESP.



Figura IV.5. Equipamento de espectrometria de massas Bruker Daltonik Microflex LT.

Fonte: Laboratório de Biofísica UNIFESP.

2.2.4 Identificação genética por Ribotipagem

Para esta análise, 15 dos 35 isolados de *Salmonella* foram enviados ao Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em São Paulo, em tubos de ensaio contendo ágar nutriente (Merck, Darmstad, Alemanha). As culturas foram analisadas pelo sistema de caracterização microbiana Riboprinter® (DuPont, Qualicon, Wilmington, DE, EUA) (Figura IV.6), e os resultados foram utilizados para estabelecer as relações genéticas entre os isolados.



Figura IV.6. Sistema de caracterização microbiana - RiboPrinter® (DuPont, Qualicon).

Fonte: http://www.kryptonbio.com/food_m_ribo.html.

Para a análise no RiboPrinter®, as colônias a partir do ágar nutriente foram estriadas em placas de Xylose lysine deoxycholate (XLD) (Merck, Darmstad, Alemanha) para confirmação da pureza da cultura. Do crescimento bacteriano obtido foi selecionada uma colônia típica de *Salmonella*, com auxílio de um bastão esterilizado e descartável fornecido pelo fabricante e transferida para a solução tampão (Qualicon, Wilmington, DE, EUA) fornecida pelo fabricante. Esta suspensão composta pelas células de *Salmonella* e 200 µL de solução tampão foi homogeneizada com auxílio de um agitador e 30 µL deste inóculo foi transferido para um tubo cônico, apropriado para introduzir as amostras no aparelho.

Posteriormente, foi realizado o tratamento da cultura para inativar as nucleases presentes bem como a preparação das células para a lise. Para a realização deste tratamento, ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados segundo o programa da unidade de tratamento térmico (Heat Treatment Station) que acompanha o RiboPrinter®. Após o tratamento térmico, 5 µL dos reagentes de lise A e B (Qualicon,

Wilmington, DE, EUA) foram adicionados a cada amostra para iniciar a ruptura da membrana das células. Em seguida as amostras foram inseridas no aparelho RiboPrinter® e processadas. No aparelho, as seguintes etapas automatizadas foram realizadas: (1) extração do DNA das células com posterior fragmentação com a enzima de restrição *PvuII* (*Proteus vulgaris*, ATCC 13315); (2) separação e transferência, caracterizada por uma corrida em gel de eletroforese, que separa os fragmentos de DNA por gradiente de peso molecular e pela transferência destes fragmentos que foram imobilizados em uma membrana de nitrocelulose, utilizando a técnica de “*Southern blotting*” modificado; (3) processamento da membrana, onde os fragmentos do DNA foram expostos a um tratamento químico-enzimático com uma sonda de DNA, derivada do rRNA de uma *E. coli* e um marcador quimioluminescente, que revelou os fragmentos hibridizados; e (4) detecção, onde a imagem padrão da banda de DNA gerada pelos fragmentos quimioluminescentes é capturada por uma máquina fotográfica, inserida no sistema e transferidas eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho. No computador, a imagem de cada gel foi tratada e comparada com o banco de dados para a caracterização dos isolados. Cinco marcadores de peso molecular foram distribuídos no gel, permitindo que cada coluna (representando os dados da amostra) fosse normalizada de acordo com um marcador padrão, baseado na posição e intensidade das bandas (HOLLIS et al., 1999). Em seguida, ocorreu o processamento da imagem digitalizada e comparação dos padrões obtidos pela enzima de restrição. Essa imagem digitalizada ficou armazenada na memória do computador e os resultados foram analisados usando o software e o banco de dados do RiboPrinter® que contém as informações e os padrões. Esses padrões foram utilizados para identificação e caracterização de todas as amostras analisadas em nível de gênero, espécie, subespécie e sorotipo. Como parte do processo de caracterização, o padrão riboprinter (amostra processada) foi automaticamente analisado e os padrões agrupados pela similaridade existente entre eles. Uma coleção de padrões riboprinter é chamada de padrão ribogruppo. Coeficientes de similaridade foram calculados pelo sistema de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e no peso relativo das bandas. Todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados como do mesmo ribogruppo.

Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade $< 0,92$, foram considerados isolados diferentes com padrões de ribotipagem distintos (BRUCE et al., 1996).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as diferentes técnicas avaliadas foram comparados entre si de acordo com o poder discriminatório de cada uma das técnicas, através de estatística descritiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 35 isolados previamente detectados e confirmados como *Salmonella* spp. pela análise microbiológica com método ISO 6579 (ISO, 2002), 100% foram identificados por todas as técnicas testadas como sendo bactérias do gênero *Salmonella* spp. Do total avaliado, 24 (68,6%) foram identificados pela técnica de sorologia clássica conforme esquema de White-Kauffmann-Le Minor (GRIMONT & WEILL, 2007), como sendo de *Salmonella* Enteritidis. *S. Sainpaul*, *S. Mbandaka*, *S. Sefttemberg*, *S. Newport* e *S. Infantis* foram identificados em dois isolados para cada sorotipo, o que corresponde a 5,7% dos isolados para cada um deles. *Salmonella* Muenchen foi identificada em um isolado (2,9%), conforme mostrado na Tabela IV.2.

Quando a técnica sorológica foi comparada com a técnica bioquímica automatizada em sistema VITEK 2TM todos os isolados foram identificados como sendo do gênero *Salmonella*. Quando avaliado o poder discriminatório do sistema VITEK 2TM, 9 (25,7%) isolados foram identificados apenas em nível de espécie e subespécie ou seja, *S. enterica* subespécie *enterica*. Isso ocorreu com um dos isolados de *S. Saintpaul*, dois de *S. Mbandaka*, um de *S. Sefttemberg*, dois de *S. Infantis*, um de *S. Enteritidis* e dois de *S. Newport*. Por outro lado, quando a comparação dos resultados foi feita em nível de sorotipo, comparando com os resultados da análise sorológica, a correlação obtida foi de 65,7%. Esta correlação em nível de sorotipo somente foi obtida com isolados de *S. Enteritidis* (Tabela IV.2). Três erros (8,6%) de identificação no sistema VITEK 2TM

foram identificados em comparação com a sorologia. Para dois isolados identificados pela técnica de sorotipagem como sendo de *S. Saintpaul* e *S. Senftenberg*, o sistema VITEK 2™ identificou como sendo de *S. Typhimurium*. Da mesma forma, o isolado identificado como *S. Muenchen* pela sorologia foi detectado como sendo *S. Enteritidis* no sistema VITEK 2™ (Tabela IV.2).

Estes resultados mostram que a análise bioquímica no sistema VITEK 2™ apresenta um bom poder discriminatório em nível de sorogrupo para *S. Enteritidis* mas é limitado para outros sorotipos quando comparado com a técnica sorológica de identificação de *Salmonella*.

Entre os isolados identificados pelo sistema VITEK 2™, 80% apresentaram probabilidade $\geq 96\%$ (excelente identificação), 17,1% apresentaram probabilidade entre 93 e 95% (muito boa identificação) e 2,9% apresentaram probabilidade entre 89 e 92%, o que caracteriza uma boa identificação.

Por outro lado, usando a técnica de espectrofotometria de massa (MALDI-TOF) para identificar isolados de *Salmonella* spp. todos os isolados testados foram identificados de forma correta em nível de gênero (Tabela IV.2). No entanto, o sistema não foi capaz de discriminar os diferentes sorogrupos da bactéria, apesar de existir no seu banco de dados do software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics) padrões para tipos de *Salmonella* como *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Dublin*, *S. Indica*, entre outras (BRUKER DALTONIK GmbH, 2008).

Durante o experimento foi selecionado um isolado de cada um dos tipos de *Salmonella* usados neste estudo e inserido no banco de dados do software FlexControl (versão 3.0, Bruker Daltonics) como sendo o padrão de referência. Em seguida, os outros isolados do mesmo sorotipo foram submetidos a uma nova avaliação pelo sistema, mas o software não foi capaz de identificar os isolados de forma correta (resultados não mostrados). Todos os isolados identificados como *Salmonella* spp. pela técnica de espectrofotometria de massa apresentaram score $> 1,9$, o que caracteriza uma identificação de espécie confiável.

Tabela IV.2. Resultados da identificação de *Salmonella* usando diferentes técnicas

No.	Identificação de <i>Salmonella</i>							
	Sorologia	Bioquímica automatizada (VITEK 2™)		Espectrometria de massa (MALDI-TOF)		Análise genética (Ribotipagem em RiboPrinter®)		
		Tipo	%	Tipo	Score	Tipo	Ribo-grupo	%
1	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,039	NA	NA	NA
2	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,240	NA	NA	NA
3	Saintpaul	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	98	<i>Salmonella</i> sp	2,245	NA	NA	NA
4	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,227	NA	NA	NA
5	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,268	NA	NA	NA
6	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	1,994	NA	NA	NA
7	Enteritidis	Enteritidis	90	<i>Salmonella</i> sp	2,299	NA	NA	NA
8	Saintpaul	Typhimurium	98	<i>Salmonella</i> sp	2,282	NA	NA	NA
9	Muenchen	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,327	NA	NA	NA
10	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,311	NA	NA	NA
11	Enteritidis	Enteritidis	95	<i>Salmonella</i> sp	2,362	NA	NA	NA
12	Enteritidis	Enteritidis	95	<i>Salmonella</i> sp	2,187	NA	NA	NA
13	Mbandaka	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	99	<i>Salmonella</i> sp	2,242	NA	NA	NA
14	Senftenberg	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	98	<i>Salmonella</i> sp	2,259	NA	NA	NA
15	Newport	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	98	<i>Salmonella</i> sp	2,005	NA	NA	NA
16	Infantis	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	99	<i>Salmonella</i> sp	2,293	NA	NA	NA
17	Newport	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	98	<i>Salmonella</i> sp	2,312	NA	NA	NA

NA = Não analisado.

Tabela IV.2. (continuação) Resultados da identificação de *Salmonella* usando diferentes técnicas

No.	Sorologia	Identificação de <i>Salmonella</i>						
		Bioquímica Automatizada (VITEK 2™)		Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)		Análise Genética (Ribotipagem em RiboPrinter®)		
		Tipo	%	Tipo	Score	Tipo	Ribo grupo	%
18	Infantis	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	99	<i>Salmonella</i> sp	2,227	NA	NA	NA
19	Mbandaka	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	97	<i>Salmonella</i> sp	2,194	NA	NA	NA
20	Senftenberg	Typhimurium	97	<i>Salmonella</i> sp	2,190	NA	NA	NA
21	Enteritidis	Enteritidis	94	<i>Salmonella</i> sp	2,304	Enteritidis	222-202-S-1	95
22	Enteritidis	Enteritidis	94	<i>Salmonella</i> sp	2,260	Enteritidis	222-202-S-1	95
23	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,316	Enteritidis	222-202-S-1	99
24	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,232	Enteritidis	222-202-S-1	98
25	Enteritidis	Enteritidis	94	<i>Salmonella</i> sp	2,353	Enteritidis	222-202-S-1	98
26	Enteritidis	Enteritidis	99	<i>Salmonella</i> sp	2,356	Enteritidis	222-202-S-1	96
27	Enteritidis	Enteritidis	94	<i>Salmonella</i> sp	2,228	Enteritidis	222-202-S-1	98
28	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,268	Enteritidis	222-202-S-1	97
29	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,268	Enteritidis	222-259-S-3	92
30	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,272	Enteritidis	222-259-S-3	92
31	Enteritidis	<i>S enterica</i> subsp. Entérica	98	<i>Salmonella</i> sp	2,284	Enteritidis	222-259-S-3	93
32	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,275	Enteritidis	222-259-S-3	94
33	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,391	Enteritidis	222-202-S-1	94
34	Enteritidis	Enteritidis	98	<i>Salmonella</i> sp	2,229	Enteritidis	222-259-S-3	94
35	Enteritidis	Enteritidis	99	<i>Salmonella</i> sp	2,208	Enteritidis	222-259-S-3	92

NA = Não analisado

Usando a técnica genética de ribotipagem com equipamento Riboprinter®, a qual utiliza a enzima de restrição *PvuII* para separar os fragmentos de DNA, os 15 isolados testados foram identificados como sendo *S. Enteritidis*, apresentando 100% de correlação com a técnica de sorologia (Tabela IV.2). O Riboprinter® identifica gênero, a espécie e o sorovar dos micro-organismos quando a similaridade do perfil de restrição obtido é igual ou superior a 87% em comparação com a biblioteca do software. Quando a similaridade obtida pelo perfil de restrição é igual ou superior a 93% o Riboprinter® identifica o micro-organismo dentro de um ribogrupos. Entre as 15 culturas de *Salmonella* spp. ribotipadas foram identificados dois ribogrupos, o 222-202-S-1 (60%) e o 222-202-S-3 (40%). Para os isolados do ribogrupos 222-202-S-1 foi observado uma similaridade no perfil de restrição que variou de 94 a 99% e entre os isolados do ribogrupos 222-202-S-3 esta similaridade foi menor, variando de 92 a 94% (Tabela IV.2).

Todas as quatro técnicas comparadas foram capazes de identificar *Salmonella* em nível de gênero, o que permite afirmar que estas técnicas são confiáveis na identificação quando se deseja obter tal identificação. No entanto, quando é necessário um poder discriminatório maior, como por exemplo em nível de sorotipo, nem todas as técnicas foram capazes de fornecer tal informação. Na Tabela IV.3 observa-se que a correlação do poder discriminatório entre as técnicas de sorologia, bioquímica automatizada e ribotipagem para identificar os isolados de *Salmonella* em nível de sorotipo.

A técnica bioquímica com sistema VITEK 2™ apresentou 65,7% de correlação com a técnica de identificação sorológica clássica, baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor (GRIMONT & WEILL, 2007), sendo que esta correlação foi obtida apenas com isolados de *S. Enteritidis*. Quando comparada a técnica bioquímica (VITEK 2™) com a técnica genética de ribotipagem, a correlação foi de 93,3%, sendo esta obtida também apenas com isolados de *S. Enteritidis*. Por outro lado a correlação entre a técnica sorológica e genética a correlação foi de 100%.

A técnica de identificação sorológica baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor é amplamente aceita como padrão internacional para a diferenciação de salmonelas abaixo do nível de subespécies (GRIMONT & WEILL, 2007). Esta técnica tem sido amplamente citada na literatura como a técnica usada para identificar tipos de

Salmonella (SCHLOSSER et al., 2000; SUMMER et al., 2004; BOSCÁN-DUQUE et al., 2007; ANVISA, 2008; EFSA, 2012). Na legislação da União Europeia, a identificação de *Salmonella* em produtos avícolas *in natura* deve ser identificada pela técnica padrão de sorologia, baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor (EC, 2011).

Tabela IV.3. Correlação entre as técnicas testadas capazes de identificar os isolados de *Salmonella* spp. em nível de sorotipo

Técnicas	% de Correlação entre as técnicas		
	Sorologia	Bioquímica (VITEK 2™)	Genética (RiboPrinter®)
Sorologia	-	65,7	100
Bioquímica (VITEK 2™)	65,7	-	93,3
Genética (RiboPrinter®)	100	93,3	-

A identificação microbiana por testes bioquímicos automatizados, como o sistema VITEK 2™ (BIOMÉRIEUX, 2008; BIOMÉRIEUX, 2010), tem sido usada para identificar micro-organismos de interesse em alimentos (SCHITTLER, 2012). Os cartões para identificar bactérias Gram negativas utilizam 64 testes bioquímicos simultâneos que permitem identificar uma ampla gama de gêneros e espécies de bactérias, incluindo alguns tipos de *Salmonella* (PINCUS, 2012). Possivelmente, as reações bioquímicas disponíveis para identificação não permitem uma completa diferenciação dos tipos de *Salmonella* uma vez que entre os isolados somente foi possível diferenciar *S. Enteritidis*. Os demais tipos de *Salmonella*, como *S. Senftenberg*, *S. Saintpaul*, *S. Mbandaka*, *S. Infantis* e *S. Newport* só foram identificados pelo sistema VITEK 2™ até o nível de espécie e subespécie.

A utilização da espectrometria de massas em laboratórios clínicos da Europa já é uma realidade. No Brasil, o primeiro espectrometro de massas com esta aplicação foi instalado em 2010 e esta ferramenta já esta sendo utilizada por alguns grupos de pesquisa voltados para estudos clínicos (PASCON et al., 2011). No entanto, estudos com isolados de importância em alimentos ainda não tem sido amplamente realizados no Brasil, apesar do grande potencial da técnica. Neste estudo, a espectrometria de

massas possibilitou a identificação do gênero *Salmonella*, mas não dos diferentes tipos da bactéria.

Segundo DIECKMANN et al. (2008), espécies bacterianas podem ser prontamente identificadas pela técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF usando células inteiras da bactéria. Nestas condições, cinco a dez picos de massa molecular variando de 2.000 a 11.000 Da são suficientes para discriminar bactérias em nível de espécie. Diferentes protocolos estão disponíveis para a preparação das amostras, bem como os tipos de matriz usada e os parâmetros medidos. Experimentos iniciais de DIECKMANN et al. (2008) mostraram que a identificação de bactérias abaixo do nível de espécie, como os de identificação de tipos de *Salmonella*, os requerimentos relacionados com o conteúdo da informação, reprodutibilidade, precisão e qualidade dos espectros são significativamente maiores do que aqueles para identificação de espécies com análise direta das células. O tipo e a concentração da matriz utilizada, a preparação das amostras, a mistura da matriz com o solvente, a concentração do ácido adicionado na matriz e o meio de crescimento da bactéria, bem como os parâmetros de medidas e a energia e o número de tiros do laser podem influenciar nos resultados. Neste estudo, as amostras foram preparadas em caldo BHI e concentradas por centrifugação com posterior preparação, conforme descrito no manual do fabricante do equipamento (BRUKER DALTONIK, 2008). Os reagentes e concentrações também seguiram os procedimentos descritos pelo fabricante do equipamento e eram os mesmos utilizados na rotina do laboratório de Biofísica da UNIFESP. Os parâmetros para a obtenção dos picos foram os adotados pelo laboratório para identificar as bactérias de interesse clínico, conforme preconizado por LEUSCHMER et al. (2003). Possivelmente, mais estudos, considerando diferentes tipos de meios de cultura, diferentes protocolos de preparação de amostras, outros parâmetros de medidas são necessários para se obter um adequado poder discriminatório da técnica de espectrometria de massas MALDITOF para isolados de *Salmonella*.

DIECKMANN e MALORNY (2011) usaram a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para identificar diferentes tipos de *Salmonella*. Os autores concluíram que a análise direta das células de *Salmonella* não permite identificar adequadamente todos os tipos de *Salmonella* mas que a mesma pode ser um teste rápido para identificar epidemiologicamente isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*,

reduzindo o número de amostras que precisam ser confirmadas pela técnica sorológica. Segundo os autores, a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF pode ser uma importante ferramenta para uma rápida triagem dos isolados de *Salmonella*, mas é necessário a subsequente identificação sorológica. O uso da espectrometria de massas para identificar tipos de *Salmonella* depende mais da identificação de biomarcadores específicos de cada um dos tipos de *Salmonella* do que a identificações de padrões.

A espectrometria de massas é uma técnica promissora para identificar diferentes tipos de micro-organismos (ASSIS et al., 2011). Para identificar diferentes tipos de *Salmonella* de interesse em alimentos, mais estudos precisam ser feitos considerando o cultivo dos isolados em diferentes tipos de meios de cultura, protocolos de preparo das amostras, parâmetros de medida e, principalmente, a identificações de biomarcadores sorotipos específicos capazes de serem identificados pela técnica.

Por outro lado, a técnica genética de ribotipagem mostrou um elevado poder discriminatório, identificando gênero e tipos de *Salmonella*, bem como o ribogruppo. Este grau de discriminação é extremamente importante em estudos epidemiológicos e também na rastreabilidade de fontes de contaminação nas indústrias de alimentos. BAILEY et al. (2002) analisaram 259 isolados de *Salmonella* pertencentes a 32 sorotipos diferentes e encontraram 80% de correção da técnica de ribotipagem com a técnica de sorologia. O sistema de identificação de isolados de *Salmonella* pelo Riboprinter® ofereceu vantagem de rapidez e simplicidade na operação (BAILEY et al., 2002; FONTANA et al., 2003). MENDONÇA (2011) analisou pela técnica de ribotipagem, 39 isolados de *Salmonella* previamente identificados como sendo dos sorogrupos Minnessota, Infantis, Schwarzengrund e Newport, provenientes de dois abatedouros de frangos. Segundo a autora, a ribotipagem dos isolados de *Salmonella* permitiu fazer ligações precisas das fontes de contaminação, identificando onde um ribogruppo aparece ou desaparece, podendo desta forma identificar a etapa da cadeia de produção industrial de frango de corte que contribui para a contaminação do produto final.

Segundo BARROS DE FREITAS (2011), a ribotipagem é a técnica escolhida pelo MAPA para identificar os isolados de *Salmonella* obtidos em carcaças de frangos relacionadas com o programa de redução de *Salmonella* (MAPA, 2003). Entre 2.293

isolados de *Salmonella* ribotipados foram identificados 14 diferentes tipos da bactéria, sendo que *S. Enteritidis* foi a mais prevalente com 47,7%, seguida de *S. Typhimurium* com 9,03% e de *S. Agona* com 5,32%. Os demais sorotipos de *Salmonella* encontrados tiveram prevalências abaixo de 5,0% (BARROS DE FREITAS, 2011). As informações sobre os ribogrupos e suas distribuição ainda não foram divulgadas pelo MAPA.

Porém, nos últimos anos alguns países têm imposto restrição de alguns tipos de *Salmonella* em produtos avícolas como, por exemplo na União Europeia onde *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* não podem estar presentes em carnes de aves *in natura* (EC, 2011). Estes tipos de *Salmonella* são os de maior impacto em saúde pública (EFSA, 2012) e, portanto, caso seja detectado a bactéria no produto final a bactéria deve ser isolada e identificada para comprovar ou não a presença destes sorotipos. Para a indústria de alimentos o tempo necessário para esta identificação pode ser crucial uma vez que o produto deve permanecer retido até a conclusão final da análise. Na legislação da União Europeia, a identificação de *Salmonella* em produtos avícolas *in natura* deve ser identificada pela técnica padrão de sorologia, baseada no esquema de White-Kauffmann-Le Minor, a qual é conhecida como padrão internacional. Entretanto, outras técnicas podem ser utilizadas, desde que previamente validadas (EC, 2011). A identificação de *Salmonella* com elevado poder discriminatório é um aspecto relevante para as indústrias de alimentos e, em especial, as do setor avícola para identificar as fontes de contaminação e a disseminação da bactéria ao longo da cadeia de produção. Desta forma a busca por técnicas confiáveis e modernas é necessário para melhorar os programas de produção de alimento seguro.

4 CONCLUSÕES

A técnica sorológica clássica foi usada para comparar outras técnicas de identificação de tipos de *Salmonella*. A técnica bioquímica automatizada em sistema VITEK 2TM apresentou um bom poder discriminatório para identificar *S. Enteritidis*, mas para outros tipos de *Salmonella* apenas identificou em nível de espécie e subespécie,

além de apresentar erros na identificação. A técnica de espectrometria de massas MALD-TOF foi capaz de identificar os isolados apenas em nível de gênero e mais estudos precisam ser feitos para melhorar a aplicação desta técnica que demonstra ser promissora na identificação de tipos de *Salmonella* de interesse em alimentos. A técnica de ribotipagem feita em equipamento RiboPrinter® que utiliza a enzima de restrição *PvuII* apresentou o melhor poder discriminatório para identificar e diferenciar isolados de *Salmonella*. Esta técnica permite identificar além do tipo o ribogruppo de *Salmonella*, o que oferece detalhamento das fontes de contaminação dos tipos de *Salmonella* ao longo da cadeia de produção, permitindo a tomada de ações voltadas para a garantia da qualidade e produção de alimentos seguro aos consumidores.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Os procedimentos de preparo de amostras de carcaças de frango para análise de *Salmonella* usados pelo Brasil, União Europeia e EUA são equivalentes. Com relação às análises de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene, o procedimento dos EUA permitiu encontrar as maiores quantidades de *E. coli*, coliformes totais e *Enterobacteriaceae*, mas foi equivalente aos demais procedimentos para a análise de aeróbios mesófilos.

A técnica de ribotipagem com sistema Riboprinter® foi a que apresentou o melhor poder discriminatório para identificar e diferenciar tipos de *Salmonella*. A técnica bioquímica automatizada com sistema VITEK 2™ foi eficiente para identificar *S. Enteritidis* quando comparada com a técnica sorológica. Por outro lado, a técnica de espectrometria de massas, apesar de promissora, identificou os isolados de *Salmonella* somente em nível de gênero.

Campylobacter jejuni, *C. coli* e *C. lari* não foram encontradas em nenhuma das amostras de carcaças e de água analisadas nas diferentes etapas do processo de abate de frangos avaliadas. Por outro lado, *Salmonella* foi encontrada em etapas aleatórias do processo de abate e diferentes tipos da bactéria podem ser encontrados em um mesmo lote de frangos. A etapa de escaldagem reduziu o percentual de contaminação e os níveis de micro-organismos nas carcaças, apesar da etapa de revisão ser uma potencial fonte de contaminação das carcaças. O resfriamento em chiller com água aumentou os níveis de *Salmonella*, mas foi eficiente em relação aos níveis de micro-organismos indicadores de qualidade e higiene, pois foi a etapa onde os menores níveis microbianos foram encontrados.

A prevalência de *Salmonella* nas etapas de criação e abate foi baixa e sua presença não foi relacionada com a ocorrência no intestino dos frangos e nas carcaças após o abate, mesmo naquelas carcaças que sofreram contaminação fecal aparente. Por outro lado, a prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foi elevada nas camas das granjas e no intestino dos animais, bem como nas carcaças com contaminação

fecal aparente e, ao contrário de *Salmonella* a sua prevalência está relacionada com a presença de contaminação fecal aparente.

As medidas de controle que demonstram ser eficazes para manter baixos níveis de *Salmonella* nas granjas de criação dos animais, no conteúdo intestinal e em carcaça de frango com e sem contaminação fecal não apresentam os mesmos efeitos sobre os resultados de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. No entanto, a prevalência de *Campylobacter* e *Salmonella* pode variar sazonalmente em uma mesma planta e isso pode ser observado entre os resultados obtidos nos diferentes capítulos desenvolvidos.

A lavagem com água potável das carcaças contendo contaminação fecal aparente foi microbiologicamente eficiente e pode ser usada como uma alternativa ao refile das partes contaminadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma Brasileira. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005.

ALLEN, V.M. Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 264-270, 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (Brasil). Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e *Salmonella* isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência bacteriana em frango – PREBAF. Brasília, 2008, 186p.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Edition. Method 2003.01. 2001.

ARSENAULT, J.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; BOULIANNE, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 1820-1828, 2007.

ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. A espectrometria de massa aplicada na classificação e identificação de microrganismos. *Revista da Universidade de Rio Verde*, v. 9, p. 344-355, 2011.

AVISTE. Produção de carne de frango. Disponível em: <<http://avisite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=13963>>. Acesso em: 21 out. 2012.

BAILEY, J. S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; STERN, N. J.; CRAVEN, S. E.; COX, N. A.; COSBY, D. E. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme PvuII. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 65, p. 1005-1007, jun. 2002.

BALE, J. A.; DE PINNA, E. M.; THRELFALL, E. J.; WARD, L. R. Kauffmann-White Scheme - 2007: *Salmonella* Identification; Serotypes and Antigenic Formulae. London: Centre for Infections Health Protection Agency, 2007. 168 p.

BARROS DE FREITAS, J. Sorovar evolution strain bank model – MAPA. In: Seminário Internacional sobre Salmonelose aviária. 2011. Rio de Janeiro. Anais ... UBABEF, 2011, 1 CD-ROM.

BERNDTSON, E.; DANIELSSON-THAM, L.; ENGVALL, A. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology*, v. 32, p. 35-47, 1996.

BERRANG, M.E.; BAILEY, J.S. On-line brush and spray washers to lower numbers of *Campylobacter* and *Escherichia coli* and presence of *Salmonella* on broiler carcasses during processing. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 18, p. 74-78, 2009.

BERRANG, M.E.; BAILEY, J.S.; ALTEKRUSE, S.F.; PATEI, B.; SHAW, W.K.; MEINERSMANN, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence and number of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 US processing plants. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 1556-1560, 2009.

BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A. Presence and level of *Campylobacter* on broiler carcasses throughout the processing plant. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 9, p. 43-47, 2000.

BILGILI, S.F.; WALDROUP, A.L.; ZELENKA, D.; MARION, J.E. Visible ingesta on prechill carcasses does not affect the microbiological quality of broiler carcasses after immersion chilling. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 11, p. 233-238, 2002.

BIOMÉRIEUX. VITEK 2, Manual User. Marcy l'Etoile, France. 2008.

BIOMÉRIEUX. Products - VITEK 2. Disponível em: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinicaldiagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_51. Acesso em: 23 out. 2010.

BLANKENSHIP, L.C.; COX, N.A.; CRAVEN, S.E.; MERCURI, J.; WILSON, R.L. Comparison of microbiological quality of inspection passed and fecal contamination condemned broiler carcasses. *Journal of Food Science*. v. 40, p. 1236-1238, 1975.

BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*, v. 40, p. 2338-2342, 2010.

BOSCÁN-DUQUE, L.; ARZÁLLUZ-FISHER, A.M.; UGARTE, C.; SÁNCHEZ, D.; WITTUM, T.E.; HOET, A.E. Reduced susceptibility to quinolones among *Salmonella* serotypes isolated from poultry at slaughter in Venezuela. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 2030-2035, 2007.

BRESSAN, M.C.; PEREZ, J.R.O. Tecnologia de carnes e pescados. Lavras: UFLA/Faepe, 2004, p. 27-30.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; GARRITY, G. M.; STALEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, 2001, p. 301.

BRUCE J. L. Automated system rapidly identifies and characterises microorganisms in foods. *Food Technology*, v. 50, p. 77-81, 1996.

BRUKER-DALTONICS. MALDI Biotyper 2.0 User Manual Bremen Germany. 2008.

BUCHANAN, R.L.; ONI, R. Use of microbiological indicators for assessing hygiene controls for the manufacture of powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 989-997, 2012.

- CANSIAN, R.L.; FLORIANI, S.T.R.; VALDUGA, E. Microbiological analysis of critical points in the chicken industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 403-406, 2005.
- CAPITA, R.; PIETRO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 67, p. 1303-1308, 2004.
- CARVALHO, A.C.F.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. *Ciência Rural*, v. 35, p. 1465-1468, 2005.
- CASON, J.A.; BERRANG, M.E.; BUHR, R.J.; COX, A.A. Effect of prechill fecal contamination on the number of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v. 67, p. 1829-1833, 2004.
- CASON, J.A.; COX, N.A.; BUHR, R.J.; RICHARDSON, L.J. Comparison of the statistics of *Salmonella* testing of chilled broiler chicken carcasses by whole-carcass rinse and neck skin excision. *Poultry Science*, v. 89, p. 2038-2040, 2010.
- CASON, J.A.; HINTON, A.; NORTHCUTT JR., J.K.; BUHR, R.J.; INGRAM, K.D.; SMITH, D.P.; COX, N.A. Coliform, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. concentrations in a multiple-tank, counterflow poultry slaughter. *Journal of Food Protection*, v. 63, p. 1184-1188, 2000.
- CASON, J.A.; HINTON, A.; NORTHCUTT JR., J.K.; BUHR, R.J.; INGRAM, K.D.; SMITH, D.P.; COX, N.A. Partitioning of external and internal bacteria carried by broiler chickens before processing. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 2056-2062, 2007.
- CFIA. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. HACCP Generic model: chicken (poultry) slaughter – forms. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/polstrat/haccp/polvol/polvole.shtml>>. Acesso em: 10 abr. 2010.
- CHRYSTAL, N.D.; HAGRAVES, S.J.; BOA, A.C.; IRONSIDE, C.J. Counts of *Campylobacter* spp. and prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 2526-2533, 2008.
- CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; CARCELLI, E. Pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em abatedouros de aves. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 307-310, 2006.
- COSSI, M.V.C.; VIEIRA DE ALMEIDA, M.; DIAS, M.R.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A. Destructive and nondestructive procedures to obtain chickens carcass samples for *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. detection. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, p. 1303-1307, 2011.
- COSSI, M.V.C.; VIEIRA DE ALMEIDA, M.; DIAS, M.R.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A. Comparison of destructive and nondestructive sampling techniques of retail chicken carcasses enumeration of hygiene indicator microorganisms. *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 29-33, 2012.

COSTA, F.N. Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos. 82 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 1996.

COX, N.A.; RICHARDSON, L.J.; CASON, J.A.; BUHR, R.J.; VIZZIER-THAXTON, Y.; SMITH, D.P.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ROMANENGHI, C.P.; PEREIRA, L.V.B.; DOYLE, M.P. Comparison of neck skin excision and whole carcass rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v. 73, p. 976-980, 2010.

DALLAL, M.M.S.; DOYLE, M.P.; REZADEHBASHI, M.; DABIRI, H.; SANAEI, M.; MODARRESI, S.; BAKHTIARI, R.; SHARIFIY, K.; TAREMI, M.; ZALI, M.R.; SHARIFI-YAZDI, M.K. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. Isolated from retail chicken and beef, Theran, Iran. *Food Control*, v. 21, p. 388-392, 2010.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Studies of contamination of three broiler breeder houses with *Salmonella* Enteritidis before and after cleaning and disinfection. *Avian Diseases*, v. 40, p. 626-633, 1996.

DIECKMANN, R.; HELMUTH, R.; ERHARD, M.; MALORNY, B. Rapid classification and identification of *Salmonella* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 24, p. 7767-7778, 2008.

DIECKMANN, R.; MALORNY, B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 13, p. 4136-4146, 2011.

DIONE, M.M.; IEVEN, M.; GARIN, B.T.; MARCOTTY, T.; GEERTS, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from broiler farms, chicken carcasses, and street-vended restaurants in Casamance, Senegal. *Journal of Food Protection*, v. 72, p. 2423-2427, 2009.

DONADO-GODOY, P.; GARDNER, L.; BYRNE, B.A.; LEON, M.; PEREZ-GUTIERREZ, E.; OVALLE, M.V.; TAFUR, M.A.; MILLER, W. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. *Journal of Food Protection*, v. 75, p. 874-883, 2012.

DUPONT QUALICON. BAX System PCR analysis with automated detection: user manual. DuPont Qualicon, Wilmington, EUA, 2003.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Directive 92/116 of 17 December 1992 amending and updating Directive 71/118/EEC on health problems affecting trade in fresh poultrymeat. *Official Journal of European Communities*, L 62, p. 1-37, 1992.

EC. EUROPEAN COMMISSION.Regulamento no. 853/2004 do parlamento europeu e do conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia. L. 226/22, 2004.

EC. EUROPEAN COMMISSION.Regulamento no 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007. Altera o Regulamento (CE) n. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. L. 332/12, 2007.

EC. EUROPEAN COMMISSION.Regulamento no 1086/2011 de la comisión de 27 de octubre de 2011 por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) n o 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo I del Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión en lo que concierne a la salmonela en la carne fresca de aves de corral. Diario Oficial de la Unión Europea, L. 281/7, 2011.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Report of task force on zoonoses data collection on proposed technical specifications for a coordinated monitoring programme for *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler meat in the EU. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 23 nov. 2006.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Trends and sources and zoonotic agents in the European Union in 2007. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 16 jun. 2010. 2010a.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008 - Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 16 jun. 2010. 2010b.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific report of efsa and ecdc. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/search.htm?text=SALMONELLA+2012>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Safety/recalls/default.html>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

FELS-KLERX, J.; JACOBS-REITSMA, W.F.; VAN BRAKEI, R.; VAN DER VOET, H.; VAN ASSELT, E.D. Prevalence of *Salmonella* in the broiler supply chain in The Netherlands. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 1974-1980, 2008.

FONTANA, J.; STOULT, A.; BOLSTORFF, B.; TIMPERI, R. Automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for rapid identification of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Newport. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 496-499, 2003.

FRANCHIN, P.R.; BATTISTELLA, P.M.D.; VIEIRA, C.R. Evaluation of multi-sequential interventions with water to reduce microbial loading as applied to chicken carcasses during slaughtering - a review. *World's Poultry Science Journal*, v. 66, p. 203-214, 2010.

FRANCHIN, P.R.; STEINMULLER, A.; DEGENHARDT, R.; STOFELS, I.; NUNES, J.G.; DAVILA, P.; NALIN, G.; GARZIEIRA, R. Eficiência da lavagem de carcaças de frango com contaminação fecal aparente, comparada ao corte das áreas afetadas, para redução de contagem bacteriana. *Higiene Alimentar*, v. 21, p. 106-110, 2007.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiología de los alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. *Federal Register*, v. 61, p. 38805-38989, 1996.

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/Frame/FrameRedirect.asp?main=http://www.fsis.usda.gov/oa/accp/hidguide.htm>>. Acesso em: 20 set. 2007.

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Laboratory Guidebook Notice of change isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg and catfish products – MLG 4.05, Athens, GA, 2011.

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Notice. Performance standards for *Salmonella* and *Campylobacter* in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments Athens, GA, 2012.

GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* spp em aves de postura comercial. 58 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, 2001.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science*, v. 80, p. 997-1002, 2003.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 35-45, 2008.

- GILL, C.O.; BADONI, M.; MOZA, L.F.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. Microbiological sampling of poultry carcass portion by excision, rinsing, or swabbing. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 35-45, 2005.
- GILL, C.O.; JONES, T. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food protection*, v. 63, p. 167-173, 2000.
- GIOTTO, D.B. Análise temporal e espacial de condenações de frangos em um matadouro-frigorífico. 115 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- GREMONT, P. A. D., WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9 ed. França: Instituto Pasteur, 2007, 166 p.
- HANSSON, I.; FORSHELL, L.P.; GUSTAFSSON, P.; BOQVIST, S.; LINDBLAND, J.; ENGVALL, E.O.; ANDERSON, Y.; VAGSHOLM, I. Summary of the Swedish *Campylobacter* program in broilers, 2001 through 2005. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 2008-2014, 2007.
- HERENDA, D.C.; FRANCO, D. Poultry diseases and meat hygiene: a color atlas. 1 ed. Iowa: Iowa State University Press, 1996, 337p.
- HOLLIS, R. J.; BRUCE, J. L.; FRITSCHER, S. J.; PFALLER, M. A. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 34, p.263-268,1999.
- HUEZO, R.I.. Chilling of broiler carcasses: microbiological and quality implications. Orientador: Julie K. Northcutt. 140 f. Dissertação (Mestrado). University of Georgia, Athens, GA, 2007.
- HUTCHISON, M.L.; WALTERS, L.D.; MEAD, G.C.; HOWELL, M.; ALLEN, V.M. An assessment sampling method and microbiological hygiene indicators for process verification in poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 145-153, 2006.
- ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis – number 17604, 2003.
- ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Salmonella* spp, number 6579. 2002.
- ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp – Part 1. Detection method, number 10271-1. 2006.

JAYCUS, L.A.; MCCLURE, P. Introducción a los indicadores microbiológicos em la industria alimentaria. 1 ed. Madrid: BIOMÉRIEUX, [200--?]. 28p.

KEGODE, R.B.; DOETKOTT, D.; KHAITSA, M.L.; WESLEY, I.V. Ocorrence of *Campylobacter* species, *Salmonella* species and generic *Escherichia coli* in meat products from retail outlets in the Fargo metropolitan area. *Journal of Food Safety*, v. 28, p. 111-125, 2008.

KING, S.; ADAMS, M.C. Incidence of *Campylobacter* in processed poultry: Is it a concern for human health? *Journal of Food Safety*, v. 28, p. 376-388, 2007.

KING, S.; GALEA, F.; HORNITZKY, M.; ADAMS, M. C. A comparative evaluation of the sensitivity of *Salmonella* detection on processed chicken carcasses using Australian and US methodologies. *Letters Applied Microbiology*. v. 46, p. 205–209.2008.

KOTTWITZ, L. B. M.; LEÃO, J. A.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA, K. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 2, p. 496-498, 2007.

KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; KELLERMANN, A.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. *Acta Scientiae Veterinarie*, v. 36, n. 1, p. 21-24, 2008.

LEUSCHMER, R.G.K.; BERESFORD, N.; ROBINSON, C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-off-flight mass spectrometry spectra. *Letters and Applied Microbiology*, v. 38, p. 24-31, 2003.

LOUREIRO, E.C. *Salmonella* serovars of human origin identified in Pará State, Brazil from 1991 to 2008. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, p. 93-100, 2010.

MAINALI, C.; GENSLER, G.; McFALL, M.; KING, R.; IRWIN, R.; SENTHILSELVAN, A. Evaluation of associations between feed withdrawal and other management factors with *Salmonella* contamination of broiler chickens at slaughter in Alberta. *Journal of Food Protection*. v. 72, p. 2202-2207, 2009.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Decreto nº. 30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 1952, 154 p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Portaria nº. 193 de 19 de setembro de 1994. Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 de set. 1994, Seção 1, p. 14309.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Portaria nº. 368 de 4 de setembro de 1997. Aprovar o Regulamento Técnico sobre as condições Higienico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. Brasília: 1997a. 14 p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº 272 de 22 de dezembro de 1997. Implantação do Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO). Brasília, 1997b. 3 p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Portaria no. 210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de nov. 1998, Seção 1, p. 226.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Instrução Normativa no. 70 de 6 de outubro de 2003. Programa de redução de patógenos monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de out. 2003, Seção 1, p. 9.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 640 de 22 de outubro de 2004. Uso de descontaminantes de carcaças em estabelecimentos habilitados à exportação. Brasília, 2004. 1p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 175 de 16 de maio de 2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília, 2005a. 38p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 176 de 16 de maio de 2005. Modificação das instruções para a verificação do PPHO, encaminhados pela Circular Nº 201/97 DCI/DIPOA e aplicação dos procedimentos de verificação dos Elementos de Inspeção previstos na Circular Nº 175/2005 CGPE/DIPOA. Brasília, 2005b. 11p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 668 de 19 de setembro de 2006. Diretrizes para preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves. Brasília: 2006. 3 p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 12 de 13 de abril de 2007. Padronização de procedimentos de controle da fiscalização de estabelecimentos produtores de carne de aves e ovos e das auditorias da DICAOC/CGI/DIPOA nos estados. Brasília, 2007. 16p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 01 de 15 de janeiro de 2009. Procedimentos para monitoramento de estabelecimentos de frangos de corte e perus para salmoneloses aviárias. Brasília, 2009. 4p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Nota Técnica. Divulgação dos resultados do banco de dados gerado a partir da implantação da Instrução Normativa 70, de 6 de outubro de 2003. Brasília, DF, 2010.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Resolução no. 4 de outubro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de out. 2011, seção 1, p. 3. 2011a.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Circular nº. 18 de 31 de outubro de 2011. Encaminha resolução no. 4 de 04 de outubro de 2011 e nota técnica que a embasa. Brasília, 2011b. 38p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (Brasil). Exportação. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 11 set. 2012.

MAREMÃE, K.; ELIAS, P.; TAAMME, T.; KRAMARENKO, T.; LILLEMBERG, M.; KAURUS, A.; HÄNMINEN, M.L.; ROASTO, M. The occurrence of *Campylobacter* spp. in Estonia broiler chicken production in 2002-2007. Food Control, v. 21, p. 272-275, 2010.

MARIN, C.; LAINEZ, M. *Salmonella* detection in feces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. Poultry Science, v. 88, p. 1999-2005, 2009.

MARTINEZ, R. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, p. 19-23, 2006.

MBATA, T.J. Poultry meat pathogens and its control. Journal of Food Safety, v. 7, p. 20-28, 2005.

MEAD, G.; LAMMERDING, A.; COX, N.; DOYLE, M.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; NASCIMENTO, V.P.; WIERUP, M. Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: A global perspective. Journal of Food protection, v. 73, p. 1566-1590, 2010.

MEAD, G.C.; THOMAS, N.L. The bacteriological condition of eviscerated chicken processed under controlled conditions in a spin-chilling system and sampled by two different methods. British Poultry Science, v. 14, p. 413-419, 1973.

MELDRUM, R.J.; WILSON, I.G. *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. Journal of Food Protection, v. 70, p. 1937-1939, 2007.

MENDONÇA, E.P.. Disseminação de *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MINE, Y. Controle e prevenção da *Salmonella* Enteritidis em frangos e ovos. Ave World, v. 3, p. 34-35, 2005.

- MIRANDA, S. H. G.; FILHO, J. H. C.; BURNQUIST, H. L.; BARROS, G. S. A. C. Normas sanitárias ou fitossanitárias: proteção ou protecionismo. *Informações Econômicas*, v. 34, p. 1-11, 2004.
- MORAN, L.; SCATES, P.; MADDEN, R.H. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, v. 72, p. 1830-1835, 2009.
- MULDER, R.W.A.W.; VEERKAMP, C.H. Improvements in poultry slaughterhouse hygiene as a result of cleaning before cooling. *Poultry Science*, v. 53, p. 1690-1694, 1974.
- MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiological Infection*, v. 16, p. 1626-1630, 2010.
- NASCIMENTO, J.M.F; STURION, G.L; TANDEL, M.C.F.F. Estratégia para redução de contaminação gastrointestinal de carcaças de frango em abatedouro com evisceração manual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 5, 2012. Campinas, Anais ... 2012. 1 CD-ROM.
- NOTERMANS, S.; TERBIJHE, R.J.; VAN SCHOTHORST, M. Removing fecal contamination of broilers by spray-cleaning during evisceration. *British Poultry Science*, v. 15, p. 115-121, 1980.
- PASCON, R.C.; BERGAMO, R.F.; SPINELLI, R.X.; DE SOUZA, E.D.; ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; VALLIM, M.A. Amylolytic microorganism from São Paulo zoocomposting: isolation, identification, and amylase production. *Enzyme Research* v. 2011, p.1-8, 2011.
- PEPE, T.; DOMINICUS, R.; ESPOSITO, G.; VENTRONE, I.; FRATAMICO, P.M.; CORTES, M.L. Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy. *Journal of Food Protection*, v. 72, p. 1718-1721, 2009.
- PETRAK, T. Z.; KALODERA, Z.; NOVAKOVIC, P.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Bacteriological comparison of parallel and counter flow water chilling of poultry meat. *Meat Science*, v. 53, p. 269-271, 1999.
- PLYM FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 25, p. 541-554, 2006.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (nº. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 568-570, 2004.
- PINCUS, D.H. Microbial identification using Biomérieux VITEK® 2 System. Disponível em: <<http://www.pda.org/bookstore>>. Acesso em 19 out. 2012.
- QUEIROZ, J.A. Presença de *Salmonella* sp. em aviários do oeste do Paraná. *Revista de Biologia e Saúde da UNESP*, v. 4, p. 76-81, 2010.

RASFF. RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm>. Acesso em: 03 dez. 2012.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; DE ZUTTER, L. External contamination of *Campylobacter*-free flocks after transport in cleaned and disinfected containers. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 40-46, 2007.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; GODARD, C.; WILDEMAUWE, C.; PASTUSZAK-FRAK, M. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 146-152, 2008.

REITER, M.G.R.; BUENO, C.M.M.; LÓPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 1903-1906, 2005.

REITER, M.G.R.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G.; LOPEZ, M.C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 1723-1725, 2007.

RODRIGO, S.; ADESIYUN, A.; ASGARALI, Z.; SWANSTON, W. Prevalence of *Campylobacter* spp. on chickens from selected retail processors in Trinidad. *Food Microbiology*, v. 22, p. 125-131, 2005.

ROSENQUIST, H.; SUMMER, H.M.; NIELSEN, N.L.; CHRISTENSEN, B.B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, p. 226-232, 2006.

ROZYNEK, E.; DZIEZANOWSKA-FANGRAT, K.; KORSAK, D.; KONIECCHZNY, P.; WARDAK, S.; SZYCH, J.; JAROSZ, M.; DZIERZANOWSKA, D. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. *Journal of Food Protection*, v. 71, p. 602-607, 2008.

RUSSEL, S.M.; COX, N.A.; BAILLEY, J.S. Sampling poultry carcass and parts to determine bacterial levels. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 62, p. 234-237, 1997.

SAMPERS, I.; JACXSENS, L.; LUNING, P.A.; MARCELIS, W.J.; DUMOULIN, A.; UYTENDAELE, M. Performance of food safety management systems in poultry meat preparation processing plants in relation to *Campylobacter* spp. contamination. *Journal of Food Protection*, v. 73, p. 1447-1457, 2010.

SANI, P.K.; MARKS, H.M.M.; DREYFUSS, M.S.; EVANS, P.; COOK, L.V.; DESSAI, U. Indicator organisms in meat and poultry slaughter operations: Their potential use in process control and the role of emerging technologies. *Journal of Food Protection*, v. 74, p. 1387-1394, 2011.

SANTOS, D. M.S.; JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, p. 39-41, 2000.

SCHITTLER, L. Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste de Santa Catarina. 92 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SCHLOSSER, W.; HOGUE, A.; EBEL, E.; ROSE, B.; UMHOLTZ, R.; FERRIS, K.; JAMES, W. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; hazard analysis and critical control point final rule in the US. International Journal of Food Microbiology, v. 58, p. 107-111, 2000.

SHINE, B. Will air-chilled chicken ever become mainstream? Disponível em: <<http://www.meatpoultry.com/news.aspx>>. Acesso em 20 mar. 2012.

SILVA, E.N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Campinas. Anais... 2004. p. 193-199.

SIMMONS, M.; FLETCHER, D. I.; CASON, J. A.; BERRANG, M. E. Recovery of *Salmonella* from retail broiler by a whole-carcass enrichment procedure. Journal of Food Protection, v. 66; p. 446-450, 2003.

SMITH, D. P. Sampling method and location affect recovery of coliforms and *Escherichia coli* from broiler carcasses. Poultry Science, v. 89, p. 169-172, 2010.

SMITH, D.P.; CASON, J.A.; BERRANG, M.E. Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. Journal of Food Protection, v. 68, p. 1340-1345, 2005.

SOUZA, L.C.T.; PEREIRA, J.G.; SPINA, L.B.; IZIDORO, T.B.; OLIVEIRA, A.C.; PINTO, J.P.A.N. Microbiological evaluation of chicken carcasses in na immersion chilling system with water renewal at 8 and 16 hours. Journal of Food Protection, v. 75, p. 973-975, 2012.

SPERBER, W.H. HACCP and transparency. Food Control, v. 16, p. 505-509, 2005.

SUMNER, J.; RAVEN, G.; GIVNEY, R. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of salmonella or salmonellosis. International Journal of Food Microbiology, v. 92, p. 199-205, 2004.

TIROLI, I.C.C.; COSTA, C.A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango recém abatidas em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. Acta Amazonica, v. 36, p. 205-208, 2006.

UBABEF. Publicações. Disponível em: http://www.abef.com.br/ubabefnovo/publicacoes_brazilianchiken.php. Acesso em: 25 out. 2012.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. CFR Part 304, et al. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Federal Register, v. 61, p. 1-45, 1998.

WHITE, P.L.; NAUGLE, A.L.; JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ROSE, B.E.; PRITCHARD, K.M.; LEVINE, P.; SAINI, P.K.; SCHROEDER, C.M.; DREYFUSS, M.S.; TAN, R.; HOLT, K.G.; HARMAN, J.; BUCHANAN, S. *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. Journal of Food Protection, v. 70, p. 582-591, 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs255/en/index.html>. Acesso em: 26 nov. 2012.

WOLDEMARIAM, E.; BOUMA, A.; VERNOOIJ, J.C.M.; STEGEMAN, A. The sensitivity and specificity of fecal and cecal culture for the detection of *Campylobacter* in Dutch broiler flocks quantified by Bayesian analysis. International Journal of Food Microbiology, v. 121, p. 308-312, 2008.

YANG, B.; XI, M.; WANG, X.; CUI, S.; YUE, T.; HAO, H.; WANG, Y.; CUI, Y.; ALALI, W. Q.; MENG, J.; WALIS, I.; LO FO WONG, D.M. DOYLE, M.P. Prevalence of *Salmonella* on raw poultry at retail markets in China. Journal of Food Protection, v. 74, p. 1724-1728, 2011.

ZANCAN, F.T.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A.; GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* investigation in transport boxes of day-old birds. Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, p. 230-232, 2000.

ZHANG, L.; JEONG, J.Y.; JANARDHANAN, K.K.; RYSER, E.T.; KANG, I. Microbiological quality of water immersion-chilled and air chilled broiler. Journal of Food Protection, v. 74, p. 1531-1535, 2011.