

Liliane Denize Miranda Menezes

Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frangos produzidos no Estado de Minas Gerais

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais –
UFMG, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva
Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2013

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

A Escola de Veterinária da UFMG que foi meu berço profissional, que eu amo tanto e me orgulho de ter sido parte dela um dia.

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária, pela oportunidade de realização dos ensaios, por oferecer recursos e espaço para o desenvolvimento deste projeto e por me acolher a tantos anos! Agradeço especialmente às Coordenadorias Regionais e seus respectivos responsáveis, pela coleta e envio das amostras.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e seus professores pela acolhida e pelos ensinamentos a mim passados.

Ao MAPA, pela iniciativa de solicitar tal pesquisa, pela disponibilidade e interesse em nos fornecer as amostras.

As empresas Analítica Instrumentos para Laboratórios, Solvereing, Biomerieux, Interlab, Datamed, pela confiança, parceria, prontidão e paciência para atender as demandas deste projeto.

Ao CNPq que forneceu todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS

À profª Lilian Teixeira Viana, minha eterna “pequena” grande amiga! Por tantos anos de amizade, carinho, respeito, solidariedade, por ser uma “irmã” tão dedicada e carinhosa, te agradeço eternamente por tudo!

Ao prof. Marcelo Resende, um profissional brilhante, um professor maravilhoso, um ser humano incrível! Sua competência inspira a mim e a muitos outros alunos e profissionais a tentar segui-lo nesta difícil jornada que é a de servir ao próximo!

À Júlia Sampaio, por toda a sua fundamental ajuda estatística, pela disponibilidade gratuita e sincera!

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, pelos conhecimentos preciosos, pelas dicas tão importantes, por toda a amizade e carinho!

À professora Maria Auxiliadora, um exemplo a ser seguido por todos. Sua dedicação é inquestionável, seus conhecimentos reconhecidos por todas as instituições de ensino no país e, mesmo tão preciosa, mantém-se firmemente polida e delicada no trato com as pessoas,

estampando um sorriso no rosto, mostrando-se disponível a ajudar quem quer que seja. Obrigada por sua contribuição neste trabalho e em minha vida!

Profª Angela Lana Quintão, nossa eterna parceira! Obrigada por sua ajuda no desenvolvimento dos delineamentos dos nossos projetos, nas análises estatísticas e em todos os momentos que precisamos!

Nazareth e Antônio Arantes, amigos e colegas do MAPA, sem vocês, o trabalho não aconteceria. Obrigada por tanta confiança, dedicação, disponibilidade e carinho!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À profª Silvana de Vasconcelos Cançado, que não foi apenas uma orientadora para mim: foi uma amiga, uma irmã, um braço direito, um ombro amigo. É a querida “mulher maravilha”, de coração meigo e pulso forte. Um ser humano invejável, que se preocupa verdadeiramente com os outros. Mulher de fibra, que mesmo passando por momentos tão difíceis e dolorosos, se doou inteiramente a este trabalho, provando sua competência e sua amizade incondicional!

Te agradeço pelas palavras de apoio, pelos puxões de orelha, pela forma carinhosa e engraçada de tocar este projeto, por me defender em momentos tão complicados, pela confiança cega em mim e por tanta amizade.

Te parablenizo por sua capacidade profissional, pela sua habilidade em trabalhar em equipe, pela sua destreza em escrever e corrigir um texto, pelo seu jeito fácil de lidar!

Sou muito grata por ter tido a oportunidade de conviver mais ainda com você e estreitar estes laços fraternos que nos mantêm e manterá sempre unidas.

O meu eterno muito obrigada!

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus, pela oportunidade e por ter me dado a oportunidade de conviver com pessoas tão maravilhosas.

Aos meus pais, César Álvares Menezes e Maria de Lourdes Miranda Menezes, pelo eterno incentivo, pela dedicação incondicional à família, pelos ensinamentos que formaram o meu caráter e minha vontade de lutar para tentar sempre ser alguém melhor, pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis e por serem sempre os anjos que Deus me deu para superar as minhas dificuldades nesta vida!

Ao Alexandre Miranda, meu marido, que suportou momentos difíceis, pela paciência e dedicação!

À minha irmã Jacqueline e aos meus irmãos Júnior e Emânio, pelo companheirismo, pelo apoio e pelo amor incondicional. À Luciana Menezes, minha cunhada querida, meu muito obrigada pela amizade!

Aos meus sobrinhos amados: Gabriel, Thiago e Maria Clara, por provaram que “tudo vale a pena se a alma não é pequena”. São pequenos no tamanho, mas grandes espíritos de luz que vieram reforçar a certeza de que estamos no caminho certo.

À minha família postiça: minha sogra Heloisa, meu sogro Rui, e seus filhos, genros, nora e netos pela acolhida e carinho.

À Eronilda, minha amiga e companheira, por todo o esforço despendido para me auxiliar no desenvolvimento deste projeto, pelo ombro amigo e pela tolerância com minhas faltas que sei, foram muitas!

Ao afilhado querido e amigo Roger, por sua dedicação e amizade, por ter me auxiliado no desenvolvimento deste trabalho e pelo respeito que sempre teve comigo!

Aos amigos e colegas de laboratório Carla, Julieta, João Paulo e Wenceslau que, de forma silenciosa e discreta, nos auxiliaram consideravelmente no desenvolvimento destes trabalhos.

Ao saudoso José Marques Neto, meu chefe e amigo eterno, que foi o que mais me incentivou a fazer meu mestrado e doutorado, que sempre esteve do meu lado, me guiando e corrigindo meus passos, ouvindo minhas queixas pessoais e profissionais, que nunca se negou em me auxiliar e que me deu a oportunidade de conviver com sua família maravilhosa que me acolheu como filha e irmã. Hoje está longe do nosso alcance, mas estará sempre abrilhantando o céu com seu humor e carinho de sempre.

À Ilka Maria Fioravante Altoé, por tanta dedicação, luta, disponibilidade e confiança! À Aline Fioravante Altoé, sua filha, pela ajuda, apoio e carinho!

À Débora Sampaio, minha amiga de coração, que, sem ela, não teria conseguido realizar este trabalho. Agradeço-te pelo esforço incondicional que dispensou a este projeto, resultando em horas ininterruptas de trabalho!

Ao prof. Tadeu Chaves de Figueiredo, meu irmãozinho do coração, amigo querido que sempre esteve disponível para me ajudar em qualquer hora que fosse!

Aos amigos que surgiram durante este projeto: Rodrigo Baião, Lídia Esser, Luciana Pires, Guilherme Resende, Andréia Guicheney, Isabela Lanza, Anna Paula e Maria Clara!

As amizades eternas: Arina Lopes Lima, Viviane Aparecida de Souza, Rubens Antônio Carneiro, Mardocheu Moreira. Pelos bons momentos, risadas, acolhidas, ajudas e exemplos de vida!

Aos demais colegas do IMA pela convivência agradável e por tanto carinho!

Aos amigos da MGS, Geovani e Iraci, sempre disponíveis, me ajudando a todo o momento em qualquer hora, sempre tornando minha vida mais fácil no IMA, obrigada pela amizade sincera!

As minhas pequenas anjas peludas: Lud (*in memorium*), Fly e Milu (*in memorium*) que me faziam companhia nas madrugadas afora, demonstrando fidelidade e disponibilidade, através de seu silêncio que me dizia tudo o que eu precisava saber na hora certa!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigado!

E, finalmente, ao meu filho muito amado, Lucas Menezes Miranda, que é minha razão de tudo isto. Minha pedra preciosa, minha luz, meu prumo. Uma criança compreensível, sensível, inteligente, companheira, amigo incondicional, que me apoiou a todo o momento, me ajudou a superar minhas dificuldades, seja dando o seu carinho, seja me defendendo nas horas incertas. Te amo muito e esta tese dedico a você!

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 Introdução	17
2 Revisão de literatura	18
2.1 Micro-organismos de importância em produtos de origem avícola.....	18
2.1.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios	18
2.1.2 Bolores e leveduras.....	19
2.1.3 Coliformes totais e termotolerantes	20
2.1.4 Gênero <i>Staphylococcus</i>	21
2.1.5 Gênero <i>Salmonella</i>	22
2.1.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.1.7 Gênero <i>Campylobacter</i>	25
2.2 Efeito de diferentes tipos de tratamentos na contaminação microbiana dos produtos de origem avícola	26
CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE OVOS DE CONSUMO PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS	29
1 Introdução	29
2 Revisão de literatura	31
2.1 Micro-organismos de importância em ovos de consumo	31
2.1.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos de consumo.....	31
2.1.2 Bolores e leveduras em ovos de consumo	31
2.1.3 Coliformes em ovos de consumo.....	32
2.1.4 <i>Staphylococcus</i> spp. em ovos de consumo	33
2.1.5 <i>Salmonella</i> spp. em ovos de consumo	33
3. Material e métodos	35
3.1. Amostras.....	35
3.1.1. Estratificação geográfica do Estado de Minas Gerais.....	35
3.1.2 Temperatura e pluviosidade das mesorregiões avaliadas	36
3.2 Variáveis Analisadas	37
3.2.1 Avaliação microbiológica dos ovos de consumo.....	37
4 Delineamento experimental	38
5 Resultados e discussão	39
5.1 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos de consumo.....	39
5.2 Contagem de bolores e leveduras em ovos de consumo.....	40
5.3 Contagens de coliformes a 35°C e a 45°C em ovos de consumo	42
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em ovos de consumo.....	43
5.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em ovos de consumo	44
6 Conclusão	45

CAPÍTULO II. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE FRANGO PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS	46
1 Introdução	46
2 Revisão de literatura	47
2.1 Micro-organismos de importância em carcaças de frango de corte.....	47
2.1.1 Coliformes em carcaças de frangos de corte	47
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	48
2.1.3 <i>Staphylococcus</i> spp. em carcaças de frangos de corte	51
2.1.4 <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frangos de corte.....	53
2.1.4.1 Mecanismos governamentais de controle da <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frango de corte.....	54
2.1.5 <i>Listeria monocytogenes</i> em carcaças de frango de corte	55
2.1.6 <i>Campylobacter</i> em carcaças de frangos de corte.....	57
3. Material e métodos	59
3.1. Amostras.....	59
3.1.1. Estratificação geográfica do Estado de Minas Gerais.....	59
3.1.2 Temperatura e pluviosidade das mesorregiões avaliadas	60
3.2 Variáveis Analisadas	61
3.2.2 Avaliação microbiológica das carcaças dos frangos de corte.....	61
3.2.3 Testes bioquímicos confirmatórios de positividade das amostras nos ensaios de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. e <i>E. coli</i> O157 nas carcaças de frango de corte	64
4 Delineamento experimental	66
5 Resultados e discussão	66
5. 1 Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C em carcaças de frango de corte	66
5.2 Pesquisa de <i>E. coli</i> O157 em carcaças de frango de corte	68
5.3 Pesquisa de <i>E. coli</i> O157:H7 em carcaças de frango de corte	69
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em carcaças de frango de corte.....	71
5.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frango de corte.....	76
5.6 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em carcaças de frango de corte	78
5.7 Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango de corte	80
6 Conclusões	83
7 Referências bibliográficas	83
ANEXO I. Comportamento bioquímico de várias espécies de micro-organismos frente aos cartões para Vitek 2 e conteúdo dos mesmos	100

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AW	Atividade de água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle
ARM	Análise de risco microbiológico
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CEASA/MG	Central de Abastecimento/Minas Gerais
CEE	Comunidade Econômica Européia
CH	Colite hemorrágica
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso aderente
DIC	Delineamento interamente casualizado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELFA	Enzime linked Fluorescent Assay
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogêncica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
EXPEC	<i>Escherichia coli</i> extra intestinais
g	Gramas
GB3	Globotriacilceramida
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução normativa
kDa	Kilodalton
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
m-CCDA	Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado
MNEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite
NMP	Número Mais Provável
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PGFE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
RFV	Relative fluorescence value – Valor de fluorescência relativa
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido ribonucleico
SHU	Síndrome urêmica hemolítica
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
spp.	Subespécie
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina <i>Shiga-like</i>
Stx	Toxina tipo <i>Shiga</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
VNC	Viável não cultivável
VT	Verotoxina
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

Quadro 1	Limiar e interpretação dos resultados de fluorescência para o teste Vidas™30 <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. e <i>E. coli</i> O157.....	63
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comportamento de <i>E. coli</i> frente as provas bioquímicas.....	20
-----------------	---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1	Proteínas do albúmen do ovo.....	30
Tabela 2	Municípios das indústrias sorteadas por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para ovos.....	36
Tabela 3	Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	36
Tabela 4	Temperaturas máxima e mínima (°C) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	38
Tabela 5	Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos mesófilos aeróbios no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	39
Tabela 6	Contagens médias (UFC/g) de bolores e leveduras no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	40
Tabela 7	Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos coliformes a 35°C e a 45°C no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	42
Tabela 8	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> spp. no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	43
Tabela 9	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e coagulase negativo no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	44

CAPÍTULO II

Tabela 1	Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para frango.....	60
Tabela 2	Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	61
Tabela 3	Temperaturas máxima e mínima (°C) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011.....	61
Tabela 4	Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 35°C e a 45°C em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	66
Tabela 5	Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 35°C por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	67

Tabela 6	Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 45°C por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas e comercializadas no Estado de Minas Gerais, por estação do ano.....	68
Tabela 7	Número de amostras positivas para <i>E. coli</i> O157 em carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	68
Tabela 8	Número de amostras positivas e negativas para <i>E. coli</i> O157 por estação do ano e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas e comercializadas no Estado de Minas Gerais.....	69
Tabela 9	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> spp. em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	71
Tabela 10	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	72
Tabela 11	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	72
Tabela 12	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	73
Tabela 13	Contagens médias (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	74
Tabela 14	Identificação bioquímica de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo e outros micro-organismos isolados no ágar Baird Parker à partir das carcaças produzidas no Estado de Minas Gerais.....	75
Tabela 15	Número de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	77
Tabela 16	Número de amostras positivas e negativas para <i>Salmonella</i> spp. por estação do ano e temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	77
Tabela 17	Número de amostras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> em carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	78
Tabela 18	Número de amostras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> por estação do ano e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	79
Tabela 19	Número de amostras positivas para <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião.....	80
Tabela 20	Número de amostras positivas para <i>Campylobacter</i> spp. por estação do ano e temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais.....	81
Tabela 21	Presença de <i>Campylobacter jejuni</i> em 240 amostras de frangos coletadas em abatedouros do Estado de Minas Gerais.....	81

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos..... 35
- Figura 2** Barreta (A) e cone para o emprego no sistema VidasTM30 (B)..... 38

CAPÍTULO II

- Figura 1** Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos..... 62
- Figura 2** Pesagem (A e B) e homogeneização das amostras (C)..... 62
- Figura 3** Colocação do gerador de microaerofilia (A) e barra de vedação (B) para análise de *Campylobacter* pelo método ELFA..... 62
- Figura 4** Distribuição das amostras nas barretas para realização das análises pelo método ELFA..... 63
- Figura 5** Equipamento VidasTM30, com cones e barretas..... 63
- Figura 6** Etapas do procedimento para realização das provas bioquímicas no VitekTM2..... 65
- Figura 7** Aparelho de identificação bioquímica VitekTM2..... 65
-

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar microbiologicamente os produtos de origem avícola produzidos em Minas Gerais foram coletadas, pelo serviço de inspeção estadual e federal, 672 amostras de ovos *in natura* e 240 amostras de carcaças de frangos de corte provenientes de cinco regiões distintas do estado. Foram realizadas as análises de contagens de mesófilos aeróbios, coliformes a 35°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp., coagulase positivo e negativo, bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* spp. nos ovos. Nas carcaças foram realizadas as análises de contagens de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisas de *Staphylococcus* spp., de *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. Os resultados encontrados nas análises dos ovos demonstraram baixas contagens de todos os micro-organismos pesquisados e também ausência de *Salmonella* spp. Porém, 34,2% das carcaças de frangos estavam contaminadas por coliformes a 35°C e 13% por coliformes a 45°C, todas as amostras foram positivas para *Staphylococcus* spp. e 9,1% das amostras foram positivas para *Salmonella* spp., 15,5% para *Listeria monocytogenes* e 2,1% para *Campylobacter* spp. Não foi observada a presença de *E.coli* O157:H7. Conclui-se que os ovos apresentam boa qualidade microbiológica e que as carcaças de frangos de corte apresentam altas contagens de micro-organismos o que pode causar problemas para o consumidor.

Palavras-chave: ovos, carcaças de frango, microbiologia

ABSTRACT

A total of 672 samples of *in natura* eggs and 240 samples of chicken carcasses were collected at federally and state-inspected establishments from the five regions of Minas Gerais - Brazil - with the aim of evaluating their microbiological quality. All egg samples were submitted to counts of aerobic mesophilic microorganisms, coliforms at 35°C and 45°C, coagulase-positive and negative *Staphylococcus* spp., molds and yeasts and also isolation of *Salmonella* spp. All samples of chicken carcasses were submitted to counts of coliforms at 35°C and 45°C and isolation of *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. Egg analyses showed low counts of all bacteria as well as absence of *Salmonella* spp. However, 34.2% of chicken carcasses were contaminated by 35°C coliforms, 13% by 45°C coliforms; all samples tested positive for *Staphylococcus* spp., 9.1% to *Salmonella* spp., 15.5% to *Listeria monocytogenes* and 2.1% for *Campylobacter* spp. *E. coli* O157:H7 was not isolated from the samples. Thus, it was concluded that the analyzed eggs had appropriated microbiological quality but high counts of microorganisms found in chicken carcasses may represent a risk to the health of consumers.

Key words: eggs, chicken carcasses, microbiology

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é, na atualidade, um dos maiores produtores mundiais de *commodities* avícolas e o maior exportador de carne de frango. O sucesso da avicultura nacional é decorrência direta dos avanços tecnológicos ligados à seleção genética e ao manejo das aves. De acordo com os dados da União Brasileira de Avicultura, o setor de produção de carne de frango, em 2011, chegou a um total de 13,058 milhões de toneladas produzidas. Esses números colocam o país em 3º lugar no *ranking* de produção ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69,8% foram destinados ao consumo interno, e 30,2% para as exportações. Com isto, o consumo *per capita*, durante o ano de 2011, de carne de frango atingiu 47,4 Kg por pessoa. A produção de ovos para consumo no Brasil, em 2011, foi de 2,7 bilhões de dúzias e o Estado de São Paulo foi o maior produtor contribuindo com 35,9% da produção brasileira, seguido por Minas Gerais, com 11,45% e Espírito Santo, com 7,77%. O consumo *per capita* de ovos no Brasil foi de 162,57 unidades/ano. A participação do Brasil como exportador mundial de ovos ainda é tímida e as exportações brasileiras somaram 16,6 mil toneladas. As principais regiões de destino do ovo brasileiro foram a África, com 11,2 mil toneladas e o Oriente Médio, com três mil toneladas (UBABEF, 2012).

Esta grande produção de carne de frango e de ovos para consumo aliada a contínua evolução na qualidade dos produtos avícolas certamente trará benefícios sociais e econômicos ao país, proporcionando boa alimentação às populações e desenvolvimento para toda a região. O mercado internacional é um dos fatores que impulsiona o crescimento em quantidade e qualidade das produções avícolas, fazendo

com que a melhoria da qualidade dos produtos seja uma busca constante. O conceito de qualidade deve ser encarado de duas maneiras diferentes: no mercado interno, para que produtos melhores e mais baratos possam ser oferecidos à população e no mercado externo, em que os principais exportadores vêm se preparando para uma competição cada vez mais intensa pelos compradores.

A maior valorização das vantagens nutritivas e funcionais dos produtos avícolas pelos consumidores depende da qualidade dos produtos que são oferecidos ao mercado, parâmetro este que influencia na aceitação, nos hábitos e decisões do consumidor final. Desta maneira, muita ênfase tem sido dada à segurança alimentar sob o ponto de vista de inocuidade, o que exige a utilização de fundamentos científicos no estabelecimento de padrões, especificações e recomendações aplicadas ao controle de alimentos para assegurar ao consumidor a aquisição de produtos que não ofereçam risco à saúde. A preocupação com a qualidade e a sanidade do produto inicia-se na elaboração da matéria-prima, passa pela manipulação industrial, segue pelo transporte e se completa nos setores de transporte, armazenamento e exposição à venda. Do ponto de vista de saúde, os conceitos de sanidade e qualidade não podem ser considerados isoladamente, uma vez que um produto pode atender aos padrões de qualidade relativos às condições físicas e organolépticas e estar sanitariamente inadequado, por conter produtos ou substâncias nocivas à saúde. A inocuidade alimentar passa então a ser uma questão essencial para os consumidores, que esperam alimentos seguros e acreditam que o governo, em cooperação com as indústrias e instituições científicas, possa garantir isto.

O conceito de perigo, inserido no estudo da segurança alimentar, é definido como

qualquer elemento de natureza física, química ou biológica que, quando ingerido, poderá afetar a saúde ou segurança do consumidor. Normalmente, em alimentos, são muito enfatizados os perigos de natureza biológica, e incidentes dessa natureza, principalmente devido a presença de bactérias patogênicas, fungos ou suas toxinas, são de ocorrência frequente. Aplicando-se esta sistemática de estudos ao caso específico da cadeia de produção de frangos e ovos, os dados disponíveis na literatura indicam que os produtos avícolas são importantes veículos de doenças de origem alimentar. Nos Estados Unidos, no período de 1973 a 1991, estes produtos foram responsáveis por 5% dos surtos e 10,8% dos casos de doenças de origem alimentar registrados. Inúmeras bactérias patogênicas são normalmente detectadas nas carcaças de frango e nos ovos. Entre elas, merecem atenção especial *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e representantes da família *Enterobacteriaceae* (Butzler, 2004, Jay et al., 2005). Desta maneira, a avaliação microbiológica dos alimentos constitui-se em um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos, e é igualmente importante para verificar se padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidas adequadamente.

O controle da presença de micro-organismos patogênicos em carcaças recém processadas e nos ovos é bastante difícil, pois a ocorrência de contaminações em carne e ovos pode ser encarada com naturalidade, uma vez que alguns micro-organismos fazem parte da microbiota das aves. A incidência e a quantidade de micro-organismos presentes na carne e nos ovos varia de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos

animais e posterior manipulação das carcaças assim como na manipulação dos ovos. O controle higiênico-sanitário na indústria de carne e de ovos deve ser um sistema dinâmico, efetuado pela aplicação de programas de controle sistematizados, elaborados pelo *Codex Alimentarius*, e adotados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que enfatizam as medidas gerais necessárias face aos fatores que direta ou indiretamente possam afetar a qualidade dos alimentos de origem animal em geral.

Assim, antes de se considerar a qualidade propriamente dita de um alimento, é fundamental a existência de uma infraestrutura higiênica desde a fabricação até a exposição do produto à venda. Tais assertivas sobre qualidade fundamentam uma co-gestão de responsabilidade entre a entidade produtora e o órgão oficial de controle de seguridade do alimento, no qual devemos alicerçar o sistema de Inspeção Industrial e Sanitário de Aves.

Considerando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar microbiologicamente ovos de consumo e carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos de importância em produtos de origem avícola

2.1.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios

Micro-organismos mesófilos aeróbios são bactérias que necessitam de oxigênio para sobreviver e que crescem em temperaturas entre 10 a 45°C, sendo sua temperatura ótima em torno de 30 e 40°C. Para um melhor desenvolvimento, estes micro-

organismos necessitam de uma atividade de água (AW) em torno de 0,97 até 0,99. Dentre as bactérias aeróbias mesófilas de interesse no estudo destacam-se espécies da família *Enterobacteriaceae*, e dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (Riedel, 1987; Jay et al., 2005).

A contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas é um bom método para avaliar a contaminação do alimento, sendo um indicador da qualidade sanitária do mesmo. O seu índice visa verificar a contaminação geral do produto e tem sido usado como indicador da qualidade higiênica na manipulação e armazenamento, fornecendo uma idéia sobre seu tempo útil de conservação. Um número elevado nesta contagem, na grande maioria dos alimentos, indica que o mesmo é insalubre, mesmo que os reconhecidos patógenos não estejam presentes e que não tenham ocorrido alterações detectáveis em suas condições organolépticas. Uma contagem elevada destes micro-organismos pode ser consequência do uso de matéria prima contaminada, processamento insatisfatório da mesma ou armazenamento prolongado do produto. É um parâmetro de importância, pois, além de indicar a qualidade sanitária do produto, pode, também, indicar que há a possibilidade de crescimento de patógenos, já que a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar é mesofílica. Considera-se, assim, que as bactérias mesofílicas podem causar tanto alterações organolépticas nos alimentos como danos à saúde do homem, caso estes alimentos sejam consumidos (Franco e Landgraf, 2008).

2.1.2 Bolores e leveduras

Bolores e leveduras são micro-organismos pertencentes ao mesmo grande grupo taxonômico (os fungos), mesmo apresentando características morfológicas e

fisiológicas distintas. São organismos que estão presentes, em sua grande maioria, no solo e no ar, e são muito importantes quanto à sua ação nos alimentos, pois, além de alguns poderem produzir toxinas (micotoxinas), têm uma elevada capacidade de decompor a maioria dos alimentos (Franco e Landgraf, 2008).

No que diz respeito à estrutura, os bolores são caracterizados por seu aspecto filamentosos e pelo crescimento em forma de uma massa disforme que se espalha rapidamente, podendo cobrir muitos centímetros quadrados em dois a três dias. As leveduras são, em sua maioria, fungos unicelulares e se diferenciam das bactérias pela maior dimensão de sua célula e pelo formato celular oval, alongado, elíptico ou esférico. Apesar de não ser conhecida nenhuma espécie de levedura responsável por casos de toxinfecção alimentar, a sua proliferação nos alimentos pode levar à sua degradação (Jay et al., 2005).

A temperatura ótima de crescimento desse grupo de micro-organismo encontra-se na faixa de 25°C a 28°C, crescendo também em temperaturas ótimas para crescimento de micro-organismos mesófilos a 35 até 37°C porém, raramente em temperatura ótima para crescimento de bactérias termotolerantes (45°C). Seu crescimento não é incomum sob condições de refrigeração (5°C), porém, abaixo de 10°C negativos os alimentos podem ser considerados microbiologicamente estáveis. A contagem de bolores e leveduras se faz necessária para obter informações sobre as condições de higiene no processamento, transporte e armazenamento de alimentos em geral (Brasil, 2003; Silva et al., 2007).

2.1.3 Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes são membros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui bactérias Gram negativo na forma de bastonetes retos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas e oxidase negativo. O gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, fazem parte do grupo coliforme. Habitam o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, entretanto, espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir e se multiplicar por longos períodos em ambientes não fecais. São capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas, a 35°C. O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições sanitárias, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem (Frazier, 1993; Pardi et al., 1995; Silva, 1995; Vanderzant e Splittstoesser, 1996; Delazari, 1998; Silva et al., 2007).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, possui a mesma definição anterior (coliformes totais), porém, integrantes dele são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas, a 45°C. É um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, que inclui 44 gêneros e 176 espécies. O gênero *Escherichia* é o melhor indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias deficientes (Jay, 2005).

Escherichia coli pode ser imóvel ou exibir motilidade através de flagelos (Brenner et al., 2005). As principais características bioquímicas de *E. coli* estão descritas na Tab. 1.

Tabela 1. Comportamento de *E. coli* frente as provas bioquímicas

Prova bioquímica	Resposta à reação
Indol	
Motilidade	
Formação de gás	
Utilização de acetato	Positiva
Produção de catalase	
Fermentação de sorbitol	
Atividade β-glucoranidase	
Voges-Proskauer	
Citrato	Negativa
Oxidase	

Fonte: Adaptado de Brenner et al. (2005).

E. coli normalmente coloniza o trato gastrointestinal de crianças dentro de poucas horas após o nascimento. Linhagens comensais raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis. No entanto, clones de *E. coli* adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem a estas bactérias maior capacidade de se adaptar a novos nichos e, dessa maneira, causar um amplo espectro de doenças, dentre elas as diarreias, as infecções do trato urinário e as meningites. Dentre as linhagens de *E. coli* intestinais causadoras de doenças diarreicas, existem seis categorias bem descritas: a enteropatogênica (EPEC), a enterotoxigênica (ETEC), a enteroinvasiva (EIEC), a enteroagregativa (EAEC), a difuso aderente (DAEC) e produtora de toxina tipo *shiga* (STEC). Os patótipos de *E. coli* implicados em doenças extraintestinais são conhecidos como ExPEC, sendo exemplos deles, *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associado à meningite (MNEC). Linhagens pertencentes a cada uma destas categorias utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, consequência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade, além da presença de bacteriófagos (Paton e Paton, 1998; Hacker et al., 1999).

2.1.4 Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus é um gênero bacteriano pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e família *Staphylococcaceae*. Atualmente, o gênero possui 47 espécies e 24 subespécies sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. São cocos Gram positivo, em forma de cachos irregulares, imóveis, não formadores de esporos, catalase positivo e anaeróbios facultativos. Geralmente, estão amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele (do homem e de animais) e de outros sítios anatômicos. A partir dessas localizações, o micro-organismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (Klood et al., 1991; Koneman et al., 2001; Jay et al., 2005; Euzéby, 2012).

Staphylococcus estão divididos em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo. Os primeiros são capazes de produzir uma enzima chamada coagulase, que é responsável pela conversão do fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina. Podem ser destacados neste grupo *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* e algumas linhagens de *S. hyicus*. *Staphylococcus* coagulase negativo são todas aquelas espécies que não produzem a enzima coagulase. Neste grupo se enquadram *Staphylococcus epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis*, dentre outros (Madigan et al., 2004; Bannerman et al., 2007).

A espécie *S. aureus* se distingue das demais pelo comportamento positivo nas provas de: coagulase (coagulação do plasma de coelho), DNase termoestável (nuclease resistente ao calor) e redução do telurito (Bannerman et al., 2007; Silva et al., 2007). Sua pesquisa em alimentos se baseia inicialmente na inoculação das diluições desejadas das amostras em ágar Baird-

Parker, cuja composição evidencia a habilidade desse micro-organismo em crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5% de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina. *S. aureus* reduz anaeróbia e aerobicamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras. O ágar Baird-Parker suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica de *S. aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente (BAM, 2001, Brasil, 2003a).

A intoxicação estafilocócica é resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positivo, principalmente *S. aureus*, durante sua multiplicação no substrato. Existem, também, relatos de estafilococos coagulase negativo produtores de enterotoxinas (Freitas et al., 2004; Hennekinne et al., 2007; Ombui e Mathenge, 2007).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas nanométricas extracelulares, globulares, com peso molecular variando de 22 a 30 kilodalton (kDa), não glicosadas e de meia-vida longa, secretadas e acumuladas durante a fase de crescimento das linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos. As toxinas são sorologicamente distintas, porém, exibem semelhanças tanto nas suas múltiplas atividades biológicas quanto nas suas sequências peptídicas. Dentre suas propriedades, estão a habilidade de causar êmese e gastriterites em animais; superantigenicidade através da ativação inespecífica de linfócitos T, seguido por liberação de citocinas e choque sistêmico; resistência ao aquecimento e a muitas enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina, explicando sua atividade no sistema

digestivo (Hennekinne et al., 2010; Santiliano et al., 2011). Porém, distinguem-se pela presença de epítomos específicos. Assim sendo, as diferentes linhagens enterotoxigênicas podem expressar toxinas antigenicamente distintas com atividades biológicas similares (Balaban e Rasooly, 2000; Hennekinne et al., 2010; Santiliano et al., 2011).

Entre as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), a intoxicação causada por bactérias do gênero *Staphylococcus* representa uma das principais causas de gastriterites e estão relacionadas à ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento. Entre os produtos alimentares que foram identificados como responsáveis por toxinfecções estafilocócicas, podem ser citados produtos à base de carne ou de frango, cogumelos em lata, produtos lácteos, ovos e maionese (Jablonski e Bohach, 1997).

2.1.5 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gamaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales* e é membro da família *Enterobacteriaceae* (Euzéby, 2012). É representado por bacilos Gram negativo, pequenos (0,7 a 1,5 por 2,0 a 5,0 micras), anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C. Estes são relativamente resistentes ao calor e substâncias químicas, porém, não sobrevivem à temperatura de 55°C, por 1 h ou de 60°C, por 15 a 20 minutos. Seu crescimento é retardado por baixas temperaturas, o que torna significativo o controle dessa variável no comércio de produtos de origem avícola. A habilidade de crescer em temperaturas abaixo de 7°C depende do sorovar envolvido. Linhagens de *Salmonella* Typhimurium são capazes de crescer em temperaturas entre 5 e 6°C, enquanto

linhagens de *Salmonella* Agona crescem abaixo de 6°C. As salmonelas se multiplicam na faixa de pH entre 4,5 e 9,5, com crescimento ótimo na faixa de 6,5 a 7,5, e em atividade de água acima de 0,93 (aa ótimo: 0,99), além de possuírem mecanismos de adaptação a condições ambientais adversas. Produzem ácido e gás a partir da glicose e outros carboidratos e, geralmente, não utilizam lactose e sacarose. São oxidase negativa e catalase positiva e são capazes de crescer utilizando citrato como única fonte de carbono. Geralmente, produzem ácido sulfídrico (H₂S), descarboxilam a lisina e ornitina e não hidrolisam a ureia, são indol negativo e reduzem o nitrato a nitrito. Sua identificação bioquímica presuntiva é tradicionalmente baseada nestas características (Bier, 1982; Varnam e Evans, 1991; ICMSE, 1996; D'Aoust et al., 2001; Gama, 2001; Gast e Holt, 2001).

As salmonelas resistem meses no ambiente, mas são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais usados, tais como fenóis, clorados e iodados. São bactérias móveis, excetuando-se *Salmonella* específicas das aves (*Salmonella enterica* sorovar Pullorum, causadora da pulorose e *S. enterica* sorovar Gallinarum, causadora do tifo aviário) (Oliveira, 1995).

Assim como outras bactérias patogênicas, as salmonelas possuem fímbrias, que consistem em apêndices de membrana mais curtos que os flagelos, cuja principal função é a de superar a barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre a célula e o substrato. As fímbrias e estruturas associadas estão relacionadas à adesão e colonização de superfícies, sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, na persistência ambiental, na formação de biofilmes e colonização e invasão de células. Tais estruturas possuem resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, contribuindo para a

hidrofobicidade da célula bacteriana e auxiliando ainda mais na agregação de novas bactérias (Corpe, 1980; Rosenberg e Kjelleberg, 1986; Tortora et al., 2000; Sauer et al., 2001; Gibson et al., 2007).

Atualmente, classificações baseadas na técnica de hibridização do DNA dividem o gênero *Salmonella* em duas espécies distintas, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*; *Salmonella enterica* subsp. *salamae*; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*; *Salmonella enterica* subsp. *houtena*; *Salmonella enterica* subsp. *indica*). No subgrupo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* encontram-se cerca de 99,5% dos sorovares mais frequentemente isolados (Guibourdenche, 2009).

Considerando a divisão proposta, a denominação dos diferentes sorotipos deve ser realizada levando-se em consideração a fórmula antigênica (antígenos O, H e K) dos micro-organismos, ou pela determinação de um nome característico, usualmente adotado para diferenciar os sorotipos apenas pela descrição do gênero (*Salmonella*), seguido diretamente de sua denominação antigênica (fórmula ou nome característico). *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, portanto, são sorotipos causadores de salmoneloses em mamíferos incluindo a espécie humana (Popoff et al., 2001; Brasil 2001).

Salmonella spp. também podem ser classificadas de acordo com a especificidade do hospedeiro e características clínicas da infecção. Portanto, podem-se considerar três categorias: *Salmonella* spp. altamente adaptadas ao homem (incluindo os sorotipos *Typhi* e *Paratyphi* A, B, C, agentes da febre tifoide e paratifoide, respectivamente); *Salmonella* spp. adaptadas aos animais (sorotipos *Dublin*, *Cholerasuis*, *Pullorum* e

Gallinarum) e *Salmonella* spp. zoonóticas, que atingem indiscriminadamente tanto homens como animais, sendo responsáveis por gastroenterite (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Hadar*) (Lax et al., 1995).

A dose infectante para humanos varia entre 10^5 e 10^8 células, porém, em pacientes imunocomprometidos tem sido observada infecção com doses menores que 10^3 células (Brasil, 2001). *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Typhimurium* e *Enteritidis* são as mais envolvidas em salmonelose humana. *Salmonella Typhimurium* foi o patógeno mais implicado em salmoneloses de origem alimentar no mundo todo até 1991 e entre 1997 e 2002. Além disso, este sorovar e outros do sorogrupo B (*Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Saint Paul, *Salmonella* Derby e *Salmonella* Paratyphi B) estiveram entre os 20 sorovares mais comumente isolados de seres humanos nos Estados Unidos entre 1973 e 1996. Atualmente, além de *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*, os sorovares de salmonelas mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar são *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Montevideo* e *S. Saint Paul*. Este micro-organismo é responsável por cerca de 32% das mortes relacionadas a toxinfecções alimentares. Nos Estados Unidos, 2 a 4 milhões de casos de salmonelose são estimados por ano e, destes casos, mais de 500 são fatais (Tauxe, 1991; Mishu et al., 1994; Mead et al., 1999; Vugia et al., 2004; Chiu et al., 2005).

2.1.6 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um micro-organismo pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e família *Listeriaceae*. É um bacilo Gram positivo,

não esporulado, anaeróbio facultativo e parasita intracelular facultativo, amplamente reconhecido como agente causador de toxinfecções alimentares. O gênero *Listeria* possui dois grupos distintos: o primeiro grupo é composto por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e, o segundo grupo, composto por *L. grayi* e *L. murrayi*. Das espécies de *Listeria* citadas, apenas duas são patogênicas: *L. monocytogenes* para seres humanos e outros animais e *L. ivanovii* para os animais (Rocourt et al., 1992; Gouin et al., 1994; Euzéby, 2012).

A espécie *L. monocytogenes* inclui treze sorovares, que se distinguem pelos carboidratos de superfície e antígenos flagelares. Os sorovares 4b, 1/2 a e 1/2 b são os agentes isolados na maioria dos casos de doenças nos animais e no homem. São responsáveis por mais de 90% das infecções em seres humanos e são também os mais frequentemente isolados em produtos alimentícios e nas linhas de produção dos mesmos (OIE, 2005; López et al., 2006; Orndorff et al., 2006; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007; Chaturongakul et al., 2008).

L. monocytogenes tem o seu genoma codificado para mais de 209 reguladores de transcrição (apenas *Pseudomonas aeruginosa* tem mais do que ela) o que reflete a sua capacidade para sobreviver e multiplicar-se em ambientes muito diferentes. Um gene deste tipo que está bem estudado é o *prfA*, que regula a expressão de diversos genes pertencentes ao grupo responsável pela virulência das espécies do gênero *Listeria* (Liu et al., 2004).

Embora *L. monocytogenes* seja considerada patogênica, existem linhagens com diferentes graus de virulência. Algumas delas são capazes de causar doença e morte, mas outras, são relativamente avirulentas.

No caso da listeriose humana, o procedimento habitual de pesquisa e contagem de *L. monocytogenes* é claramente insuficiente, porque não permite diferenciar linhagens virulentas das não virulentas (que provavelmente são a maioria), e, mais importante ainda, por se tratar de uma bactéria ubiqüitária amplamente distribuída no meio ambiente (Liu et al., 2003; McLauchlin et al., 2004; López et al., 2006; López et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) não faz, ainda, distinção de linhagens, referindo-se à espécie como um todo, quando mencionam os riscos associados aos diferentes tipos de alimentos (Barbalho et al., 2005).

Devido ao desenvolvimento de suas ferramentas genéticas, *L. monocytogenes* se tornou recentemente a detentora do melhor sistema de bases genéticas e moleculares do parasitismo intracelular. Estes mecanismos são divididos em quatro passos: a entrada na célula, a capacidade de escapar dos compartimentos fagossomais, a capacidade de multiplicação intracitosólica e a capacidade de se espalhar de célula para célula, o que é mediado por um mecanismo de movimento do citoplasma da célula infectada (Gouin et al., 1994).

L. monocytogenes possui uma grande resistência a condições adversas, tais como a capacidade de se desenvolver em temperaturas de refrigeração e manter-se viável no ambiente por longos períodos de tempo. Além disto, esta bactéria possui grande habilidade de formar biofilmes em superfícies, dificultando seu controle e erradicação. Uma vez instalada em uma indústria, dificilmente será possível a eliminação dela do ambiente, visto que possui uma extraordinária capacidade de multiplicação em ambientes inóspitos e

resistência a agentes sanitizantes (Skandamis et al., 2007).

2.1.7 Gênero *Campylobacter*

Campylobacter spp. são micro-organismos pertencentes ao filo *Proteobacteria*, classe *Epsilonproteobacteria*, ordem *Campylobacteriales* e família *Campylobacteriaceae*. O gênero é constituído de bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaiivota ou espiral, suas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento. São bactérias Gram negativo, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias não são pigmentadas usualmente. As células apresentam um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades que os tornam móveis, apresentando um movimento em forma de "saca-rolha" ou "vai e vem". São sensíveis ao oxigênio, microaerófilos, requerendo de 3 a 5% de oxigênio e de 2 a 10% de dióxido de carbono e não se desenvolvem em meios com pH abaixo de 4,9 (Humphrey et al., 2007; Nachamkin, 2007; Euzéby, 2012).

Na atualidade, o gênero engloba 32 espécies e 13 subespécies. As espécies mais frequentemente isoladas de animais e de seres humanos são *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus*. Estas espécies não utilizam carboidratos como fonte de carbono e não fermentam nem oxidam açúcares, devido a isso, obtêm energia a partir de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido carboxílico. São extremamente sensíveis ao cloreto de sódio e considerados fastidiosos, pois sua multiplicação ocorre de forma lenta. Acredita-se que esta característica seja devida ao pequeno tamanho do seu genoma (1600 Kb a 1700 Kb, compreendendo em tamanho a 30% do genoma de *E. coli*). Esta característica também pode estar relacionada

ao fato de não fermentarem carboidratos. Por possuir o genoma relativamente pequeno, o gênero *Campylobacter* apresenta um número menor de genes, comparado ao de outros micro-organismos patogênicos e isto se reflete na necessidade de um meio complexo para seu desenvolvimento, o que dificulta sua sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente (Vandamme, 2000; Bhunia, 2008; Franco e Landgraf, 2008; Euzéby, 2012).

Em culturas mais antigas ou sob condições de cultivo adversas, as células de *Campylobacter* spp. podem adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante. A transição da morfologia celular vibrióide para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, não são detectáveis por metodologias convencionais estando na forma viável, porém não cultivável (VNC) (Bovill e Mackey, 1997; Nachamkin, 2007).

As espécies patogênicas para o ser humano são classificadas como termofílicas, por apresentarem temperatura ótima de multiplicação de 42°C, sendo que as temperaturas máximas e mínimas giram em torno de aproximadamente 30°C a 46°C, respectivamente. São micro-organismos rapidamente destruídos pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo de alimentos (Humphrey et al., 2007). Dentre as espécies termofílicas, *C. jejuni* subespécie *jejuni*, *C. coli* e *C. lari* possuem grande importância como patógenos para o homem. *C. jejuni* e *C. coli* são as mais prevalentes como causadoras de problemas gastrintéricos em seres humanos, e a carne de frango e seus derivados são considerados o principal veículo transmissor de *Campylobacter* para o homem (Butzler, 2004; CDC, 2010).

A campilobacteriose é uma doença com manifestações gastrointestinais que tende a manifestar uma melhora espontânea do quadro clínico do paciente, em cerca de sete dias. Todavia, em alguns casos, podem ocorrer graves sequelas da infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios. A GBS é caracterizada como uma doença autoimune e pós-infecciosa que causa destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, levando a paralisia neuromuscular aguda, podendo comprometer os músculos da respiração e causar a morte. O desenvolvimento da GBS ocorre através de um mecanismo de mimetismo antigênico entre os lipooligosacarídeos da bactéria e os gangliosídeos da membrana dos nervos periféricos (Rees, 1995; Takahashi et al., 2005). Em outros casos, a infecção por *C. jejuni* pode desencadear a Síndrome de Miller Fisher, que se caracteriza por perda dos reflexos oculomotores e relativa perda da força nas extremidades e tronco. O processo é mediado por anticorpos autoimunes contra a mielina do sistema nervoso (Overell e Willison, 2005).

A campilobacteriose é a doença de origem alimentar mais comum na Dinamarca, onde foram registrados em 2003, 3.542 casos, com 90% das infecções sendo causadas por *C. jejuni*. Em Singapura, as principais bactérias isoladas em 7.344 pacientes com diarreia foram: *Salmonella* spp. (10,1%); *Campylobacter* spp. (1,2%); *Shigella* spp. (1,1%); *Vibrio parahaemolyticus* (0,8%) e *Vibrio cholerae* (0,2%) (Cocker et al., 2002; Ranthum, 2008).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a campilobacteriose é a causa mais comum de doença diarreica. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), são notificados aproximadamente 15 casos

de campilobacterioses por ano para cada 100.000 habitantes. Muitos casos não são diagnosticados ou relatados, podendo-se estimar que esta doença afete mais de 2,4 mil pessoas por ano. Acredita-se que o número de casos esteja subestimado, porque muitos hospitais não fazem cultura de rotina para o diagnóstico deste agente (CDC, 2010).

A maioria dos casos de campilobacteriose é esporádico e os surtos são incomuns, porém a infecção pode ocorrer pela ingestão de menos de 500 UFC. Uma maneira de se infectar é cortar carne de aves em uma tábua de corte e, posteriormente, utilizar a mesma tábua sem lavar para preparar legumes ou outros alimentos crus ou levemente cozidos (Black et al., 1988; Keener, 2004; Park, 2002; Butzler, 2004).

2.2 Efeito de diferentes tipos de tratamentos na contaminação microbiana dos produtos de origem avícola

Na produção de alimentos, processos como aquecimento, congelamento, resfriamento, dentre outros, são frequentemente adotados para o controle da contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Após estes tratamentos, uma população de micro-organismos pode ser morta, outra pode sobreviver por não ter sofrido injúria e outra pode ser injuriada subletalmente. Uma célula injuriada pode ser definida como aquela que sobreviveu ao estresse, porém não perdeu algumas de suas qualidades distintas. Sob estresse de temperatura, muitas células injuriadas têm suas barreiras de permeabilidade afetadas (estruturas da superfície e membrana citoplasmática), perdem material celular como magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+), ácidos nucleicos, além de proteínas. Sob condições de congelamento, algumas reações químicas param e as reações enzimáticas ficam lentas.

Por indisponibilidade de água livre, há um aumento de concentração de solutos, os cristais rompem as células de tecidos e de micro-organismos. Muitos componentes estruturais e funcionais dos organismos são afetados, como parede celular, membrana citoplasmática, ribossomas, DNA, RNA, enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico e outras enzimas. A membrana celular é a estrutura mais comumente afetada (Ray, 1989; Jay, 2005; Massaguer, 2005; Wu, 2008).

Uma vez injuriadas, as células são capazes de formar colônias em meio não seletivo, mas não no meio seletivo. Organismos injuriados são potencialmente importantes porque podem se tornar funcionalmente normais em ambiente favorável, visto que algumas mudanças celulares podem ser acionadas a fim de reparar suas estruturas e organelas danificadas assim como sintetizar proteínas e ácidos nucleicos necessários para o seu desenvolvimento. Desta forma, as células injuriadas podem apresentar uma extensão da fase *lag*, em comparação com células não injuriadas. Mediante esta extensão da fase *lag*, as células injuriadas mostram capacidade de reparar seus próprios danos e voltar às suas condições fisiológicas normais com a iniciação do crescimento e divisão celular em condições favoráveis. A retomada das capacidades perdidas tem sido chamada de ressuscitação, porque as células são revividas à partir de uma “morte” aparente. Portanto, determinar a presença de micro-organismos nestas condições é importante em muitas áreas, a fim de preservar a saúde do consumidor (Hartsell, 1951; Busta, 1976; Ray, 1989; Shintani, 2006; Wu, 2008).

As células danificadas variam com o tipo de estresse, a espécie microbiana, a composição e a consistência do alimento e as condições de estocagem. É importante ressaltar que nem todas as células de uma população irão

sofrer o mesmo grau de injúria e nem todas as formas de estresse produzem injúrias identificáveis. Organismos mais complexos são mais sensíveis às baixas temperaturas que os menos complexos. A maioria dos micro-organismos é destruído ou injuriado mais efetivamente na faixa de -2°C a -10°C do que a -15°C . A -30°C , o efeito letal é ainda menos pronunciado. É o caso de carne de frango congelada, pois 60 a 83% das células de *Salmonella* spp. contaminantes sobrevivem em tratamento de congelamento a -20°C , após 126 dias, e apenas 1,3 a 5,8% destes micro-organismos sobrevivem após 5 dias a -2°C a -5°C . Tal efeito da temperatura não se aplica quando o micro-organismo está presente em soluções salinas, onde o ponto de congelamento cai abaixo de -1°C (Ray, 1989; Jay, 2005; Massaguer, 2005).

Meldrum e Wilson (2007) realizou um estudo no País de Gales entre março e dezembro de 2003 em amostras de carne de frango. Neste estudo, 73,5% das 544 amostras de carne de frango fresca e 71,9% das 192 amostras congeladas analisadas estavam contaminadas por *Campylobacter*. Desta forma, o autor demonstrou que o congelamento reduziu a contagem inicialmente, mas não prejudicou a recuperação do *Campylobacter*.

Um entrave observado pelos pesquisadores quanto ao controle microbiológico em alimentos é o de que células injuriadas podem estar presentes, mas não serem detectáveis por não serem hábeis para se desenvolver em meio seletivo. O potencial para risco é ainda preocupante pelo fato de serem capazes de retomar suas habilidades e, quando for o caso, produzir toxinas. Muitos métodos rápidos para detecção de patógenos em alimentos estão comercialmente disponíveis. O limite de detecção é tal que são requeridos um estágio de enriquecimento e testes primários para permitir a multiplicação do micro-organismo

alvo. As condições de enriquecimento são particularmente importantes quando testadas em amostras de alimentos nas quais células injuriadas podem estar presentes. Entretanto, muitos métodos rápidos que recomendam o uso de enriquecimento seletivo direto com ou sem temperatura de incubação elevada podem gerar resultados falso-negativos. Assim, a incorporação de um estágio de ressuscitação usando meio de pré-enriquecimento não seletivo ou outro método de recuperação efetivo melhora as taxas de detecção destes métodos de ensaio. Portanto, procedimentos de recuperação adequados poderiam ser incorporados nos métodos de detecção e enumeração rotineiros e adotados para finalidades regulatórias e de controle de qualidade para garantir que uma verdadeira análise microbiológica seja obtida (Wu, 2008).

Oliveira e Oliveira (2012) realizaram um estudo de detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. por um método rápido (SimPlate®) e pelo método convencional

(plaqueamento direto em ágar mCCD), determinando a frequência e o nível de contaminação em 75 amostras de carcaças de frangos (25 pré-chiller e 25 pós-chiller obtidos em abatedouros sob inspeção federal no Estado de Minas Gerais e 25 amostras congeladas, coletadas no comércio varejista). As amostras avaliadas, independentemente do método utilizado, apresentaram *Campylobacter* spp. em 56,0% das carcaças antes do chiller e 44,0% após o chiller. A contagem das amostras congeladas se apresentou abaixo do limite de detecção do método. Das 75 amostras testadas, 34,7% foram positivas para *Campylobacter* spp. Das amostras positivas, 38,5% foram identificadas como *C. jejuni* e, entre estas, o maior número de *C. jejuni* foi obtido nas carcaças de frango antes do chiller (42,9%), seguido de carcaça de frango após o chiller (36,4%). O estudo mostrou que a detecção e enumeração é variável, e que o uso do SimPlate® apresentou uma melhor taxa de recuperação de células de *Campylobacter* spp.

CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE OVOS DE CONSUMO PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O ovo é um dos alimentos mais completos para a alimentação humana, apresentando uma composição rica em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas de alta qualidade que reúnem vários aminoácidos essenciais de excelente valor biológico. Além disso, é considerado uma fonte protéica de baixo custo, de fácil aquisição, podendo contribuir para a melhoria da dieta de famílias de baixa renda (UBABEF, 2012). Por ser rico em nutrientes e ser de alta digestibilidade, o ovo exige alguns cuidados para que não se transforme em fonte de intoxicação alimentar e para que chegue ao consumidor com um bom padrão de qualidade.

O interior dos ovos recém-postos é geralmente livre de micro-organismos devido à proteção natural proveniente das estruturas físicas e da constituição química do albúmen. Porém, há duas explicações para a presença de micro-organismos em ovos considerados frescos e que não tenham sido expostos a condições ambientais adversas. A primeira é devida à incorporação de bactérias durante a formação do ovo no ovário ou oviduto, podendo ser considerada de origem congênita (vertical); e a segunda ocorre quando há penetração de bactérias através da casca, após a postura, sendo chamada de contaminação extragenital (horizontal). Desta maneira, a contaminação do ovo pode ocorrer antes da postura ou após esta, resultando na perda da qualidade ou na transmissão de doenças das aves para o homem (Romanoff e Romanoff, 1963; Stadelman e Cotterill, 1986).

Os ovos possuem barreiras físicas e químicas naturais que dificultam a penetração e/ou permanência de micro-organismos em seu interior. As barreiras físicas do ovo incluem a cutícula (ou mucina), composta por mucoproteína cujos polissacarídeos são constituídos basicamente de glicose, manose, frutose e galactose que tem por finalidade obstruir parcialmente os poros da casca (Ordóñez, 2005). Em seguida vem a casca, considerada a mais resistente contra a entrada de micro-organismos do ambiente. As membranas internas do ovo, que funcionam como um filtro, tem um importante papel para o impedimento da passagem dos micro-organismos através dos poros para o albúmen. O albúmen denso também é considerado uma barreira de proteção física do ovo, devido à sua viscosidade. Além disso, quanto maior a quantidade do albúmen denso, mais centralizada a gema fica, mantendo-a equidistante da casca e suas membranas e de possíveis micro-organismos que consigam atravessá-las. As barreiras químicas do ovo incluem a presença de enzimas antibacterianas presentes no albúmen como a avidina, cistatina, lisozima, ovoflavoproteína, ovomacroglobulina, ovomucóide, ovotransferrina (Tab. 1) e também a deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação bacteriana (Romanoff e Romanoff, 1963; Overfield, 1974; Pardi, 1977; Stadelman e Cotterill, 1986; Board et al., 1994; Oliveira e Silva, 2000).

Tabela 1. Proteínas do albúmen do ovo

Proteína	% no albúmen	Características
Avidina	0,05	Liga-se a biotina indisponibilizando-as para as bactérias
Cistatina	0,05	Inibe a tiol proteinase
Lisozima	3,4	Causa lise ou degrada as paredes celulares de bactérias por hidrolisar a ligação glicosídica denominada ($\beta 1 \rightarrow 4$) entre a N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico. Esta ligação é importante pois é a estrutura que confere rigidez à parede celular de bactérias evitando o aumento de volume celular e lise devido à entrada osmótica de água
Ovoflavoproteína	0,8	Liga-se a riboflavina indisponibilizando-as para as bactérias
Ovoinibidor	1,5	Capaz de inibir a tripsina, quimiotripsina e enzimas microbianas
Ovomacroglobulina	0,5	Alta atividade antigênica
Ovomucóide	11	Inibição da tripsina e de proteases fúngicas
Ovotransferrina	12	Liga-se a íons metálicos, que seriam usados para sobrevivência das bactérias. Acentua a quelação dos íons ferro pela ovotransferrina, indisponibilizando-o para o crescimento bacteriano

Fonte: Pardi, 1977; Stadelman e Cotterill, 1986; Hincke et al., 2000; Lehninger, 2004; Ahlborn e Sheldon, 2005; Ordóñez, 2005; Alleoni, 2006.

As enzimas anti-bacterianas como ovoalbumina, ovotransferrina, lisozima, ovoflavoproteína e avidina impedem a multiplicação bacteriana, seja por indisponibilizar nutrientes para as mesmas, seja por lisar os micro-organismos. No entanto, quando ocorre a diluição das mesmas, é possível verificar a viabilidade de micro-organismos mesófilos (Li-Chan e Nakai, 1989).

Barros et al. (2001), pesquisando a presença de *S. Enteritidis* no conteúdo interno do ovo (albúmen e gema) após sua imersão em solução contendo essa bactéria, atribuíram a sua ausência a fatores antibacterianos encontrados no albúmen, como a ação de enzimas antibacterianas e deficiência do íon ferro.

Segundo a Portaria nº 01 de 21 de fevereiro de 1990 (Brasil, 1990), que apresenta as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados, o ovo integral líquido deve apresentar contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios máxima de 5×10^4 UFC/g, ausência de coliformes

termotolerantes (45°C) e *Staphylococcus aureus* em 1 g de ovo e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de ovo. Para ovos *in natura*, essa legislação não faz nenhuma referência a padrões microbiológicos, enquanto a Resolução nº 12, de 2001 (Brasil, 2001) determina apenas a ausência de *Salmonella* spp. nestes alimentos.

Da mesma forma que no Brasil, nos Estados Unidos e na União Européia preconiza-se apenas a pesquisa de *Salmonella* spp. sendo a ausência desta bactéria o resultado desejado (União, 2007). No Canadá, a legislação já estabelece a pesquisa de coliformes ($1,0 \times 10^1$ UFC/g) e contagem bacteriana total ($5,0 \times 10^1$ UFC/g) para ovos líquidos, refrigerados e desidratados (Canadian, 2011b).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos de importância em ovos de consumo

2.1.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos de consumo

Em ovos coletados em diversos pontos de venda do município de Botucatu (SP), Langoni et al. (1995) verificaram a presença de, pelo menos, uma bactéria em 57,84% das amostras pesquisadas e em 8,82% havia mais de uma bactéria presente. Dos micro-organismos mesófilos encontrados, foi observada a presença das bactérias *Streptococcus* β hemolíticos (17,65%), *Escherichia coli* (10,7%), *Staphylococcus epidermidis* (9,8%), *S. aureus* (6,86%), *Streptococcus* α hemolíticos (5,88%), *S. enterica* Enteritidis (1,96%), *S. enterica* Virchow (0,98%), *S. enterica* Typhimurium (0,98%), *Corynebacterium* spp. (2,94%), *Bacillus cereus* (2,94%), *Enterobacter aerogenes* (1,96%), *Micrococcus* spp. (0,98%), *Enterobacter cloacae* (0,98%), *Pasteurella haemolytica* (0,98%) e *Shigella* spp. (0,98%).

Um estudo com o objetivo de analisar a qualidade bacteriológica de ovos de galinha, obtidos em supermercados, feiras livres, postos de venda e granjas da região de Goiânia (GO), teve como resultado 40,44% das amostras contaminadas por fungos e bactérias, dentre elas mesófilos aeróbios, como bactérias da família *Enterobacteriaceae*. As proporções das espécies de mesófilos aeróbios, encontradas dentre os micro-organismos detectados foram: *Enterobacter* spp. (33,04%), *Escherichia coli* (12,50%), *Citrobacter* spp. (4,46%), *Salmonella* spp. (4,46%) e *Klebsiella* spp. (0,89%) (Andrade et al., 2004).

Aragon-Alegro et al. (2005) observaram a presença de micro-organismos mesófilos aeróbios com contagem de até $2,4 \times 10^5$ UFC/g em ovos coletados em uma indústria de processamento durante a etapa de quebra. Dentre as amostras positivas detectadas pelos autores, 50% também estavam acima do preconizado pela legislação.

A presença de quantidades relevantes de micro-organismos mesófilos foi observada por Adesiyun et al. (2006). Estes autores detectaram a presença destes micro-organismos em 34,8% dos ovos coletados em granjas, 38,7% em supermercados e 44,9% dos ovos vendidos em pequenos comércios em Trindade e Tobago, Caribe.

Klein (2010) pesquisou micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos de três grandes distribuidoras de ovos do Estado de Minas Gerais e encontrou 62,5% de amostras positivas. Dentre as amostras positivas, 75,56% ainda apresentaram contagens acima do preconizado pela legislação para ovo integral ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) estando, portanto, em desacordo com a mesma.

Entretanto, Figueiredo (2008), ao avaliar os efeitos do armazenamento e da idade da poedeira sobre a qualidade interna de ovos de consumo produzidos em Minas Gerais detectaram a presença de bactérias mesófilas aeróbias em apenas 1,7% das amostras.

2.1.2 Bolores e leveduras em ovos de consumo

Nenhuma das legislações brasileiras aborda a pesquisa de bolores e leveduras nem os consideram como micro-organismos de importância para os ovos de consumo. No entanto, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (Brasil, 1997) deixa claro que são considerados impróprios para consumo os ovos que apresentem a

presença de fungos, externa ou internamente. Alguns trabalhos mostraram a capacidade dos bolores e leveduras de se apresentarem viáveis na superfície externa dos ovos. Silva et al. (2013) avaliaram a presença destes micro-organismos na casca de 600 ovos, higienizados e não higienizados, embalados em diferentes condições (filme plástico, embalagem em condições de vácuo parcial e embalagem em condição de vácuo com sequestrantes de O₂) e armazenados durante 28 dias em temperatura ambiente. Os autores observaram que a superfície dos ovos embalados em condições de vácuo parcial, independentemente da higienização, apresentaram colônias de bolores e leveduras em quantidades elevadas já aos sete dias de armazenamento. Para os ovos embalados em filme plástico, foi observada uma menor contaminação por fungos, tanto para os higienizados quanto para aqueles não higienizados. Os ovos, higienizados ou não, que foram embalados em condição de vácuo com sequestrantes de gás O₂, apresentaram baixas contagens de bolores e leveduras até os sete dias de armazenamento porém, após este período, foi observado um aumento na quantificação destes micro-organismos apenas nos ovos que não foram higienizados.

Ao avaliar a casca e a câmara de ar de ovos com suspeita de contaminação fúngica, Fraga et al. (2007) encontraram vários gêneros diferentes nas cascas e câmaras de ar. Foram encontrados na superfície da casca os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Penicillium*. Já na câmara de ar foram encontrados os gêneros *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monocilium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichophyton* e *Verticillium*.

Após a análise de suabes da superfície interna e externa dos ovos armazenados por 14 dias Magalhães (2007) observou que

ovos com presença de fissuras na casca apresentavam maior contagem de bolores (29,3 UFC/g), enquanto os ovos sem fissuras na casca apresentaram apenas 17,7 UFC/g. Foi observado também que os ovos embalados em filme plástico apresentaram menor contagem de bolores (17,5 UFC/g) em comparação aos ovos que não estavam assim embalados (29,5 UFC/g).

Klein (2010), com o objetivo de avaliar a qualidade interna de ovos de consumo de três distribuidoras do Estado de Minas Gerais, analisou 144 amostras de ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração durante 21 dias e encontrou três amostras (2,08%) com presença de bolores e leveduras sendo que, das três amostras, duas ocorreram em ovos armazenados em temperatura ambiente e uma amostra em ovo armazenado sob refrigeração.

Figueiredo (2012) analisou 192 amostras de ovos com e sem aplicação de óleo mineral sobre a casca e com e sem utilização de embalagem de plástico e não observou a presença de bolores e leveduras no conteúdo interno dos ovos durante os 124 dias de armazenamento sob refrigeração.

2.1.3 Coliformes em ovos de consumo

Cardoso et al. (2001), ao analisarem a qualidade microbiológica de 48 ovos comercializados na região de Descalvado (SP), observaram que 33,3% dos ovos apresentavam contaminação por coliformes totais e 8,33% por coliformes termotolerantes.

Andrade et al. (2004) analisaram o conteúdo interno de 708 ovos produzidos em quatro granjas da região metropolitana de Goiânia (GO) e encontraram 1,83% dos ovos contaminados por *Escherichia coli* e 2,20% contaminados por *Enterobacter* spp. Adesiyun et al. (2006) realizaram análises

microbiológicas em ovos coletados em granjas, supermercados e pequenos comércios de Trindade e Tobago, Caribe, e também observaram uma baixa contaminação dos ovos por *Enterobacter* spp. (3,3%), *Klebsiella* spp. (1,6%) e *Citrobacter* spp. (0,5%).

Klein (2010), pesquisando coliformes totais e termotolerantes em ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração, de diferentes distribuidoras do Estado de Minas Gerais, encontrou 20,1% de amostras positivas para coliformes totais e 1,38% para coliformes termotolerantes.

Figueiredo (2012), com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de óleo mineral sobre a casca e a utilização de embalagem plástica na qualidade microbiológica de ovos de consumo analisou 1.920 ovos armazenados por até 125 dias sob refrigeração e observou que a aplicação de óleo e a utilização de embalagem não influenciaram nos resultados microbiológicos. O autor encontrou baixas contagens de coliformes termotolerantes nos ovos analisados ($<1,0 \times 10^0$ UFC est. a $5,2 \times 10^2$ UFC).

Figueiredo et al. (2013) analisaram a qualidade microbiológica de ovos de poedeiras com 30 e 60 semanas de idade e armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração e não observaram a presença de coliformes termotolerantes. Uma única amostra (0,8%) foi positiva para *Enterobacter* spp.

2.1.4 *Staphylococcus* spp. em ovos de consumo

Aragon-Alegro et al. (2005) não observaram a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de ovos coletadas em indústria de processamento. Klein (2010) verificou a presença de *Staphylococcus* spp. em 17 (11,8%) das 144 amostras de ovos

comercializados no Estado de Minas Gerais, sendo todas negativas para o teste da coagulase.

Com o objetivo de avaliar a qualidade interna de ovos de consumo, Figueiredo (2012) observou que, das 120 amostras analisadas, 14 amostras foram positivas (11,7%) para *Staphylococcus* spp. e após a realização da prova da coagulase e de testes complementares, não foi observada a presença de *S. aureus* em nenhuma das amostras positivas.

Segundo Freitas et al. (2009), a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo deve ser considerada, visto que existe a possibilidade de estes micro-organismos produzirem toxinas responsáveis por intoxicação alimentar e, também, pelo fato de que não existe no Brasil uma legislação com determinação de limites para estes em alimentos.

2.1.5 *Salmonella* spp. em ovos de consumo

Nos ovos, a incidência e a quantidade desses micro-organismos variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos na sua manipulação. Em vários países a desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são considerados medidas necessárias para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana no mesmo (Morris, 1990; Hammack et al., 1993; Thiagarajan et al., 1994).

Keller et al. (1995) observaram em dois diferentes experimentos, que 27,1% e 31,4% dos ovos em formação no oviduto de poedeiras infectadas com *S. Enteritidis* (inoculação oral com 10^8 UFC) apresentavam-se contaminados. No entanto, nos ovos recém-postos, a taxa de contaminação variou entre zero e 0,6%,

sugerindo que fatores como anticorpos, enzimas antibacterianas, sequestro de ferro e proteínas inibidores de proteases bacterianas presente na gema e albúmen são capazes de controlar a contaminação dos ovos por *S. Enteritidis* antes da completa formação da casca e da postura dos ovos.

Peresi et al. (1999), analisando possíveis causas de surtos de salmonelose notificados no período de julho de 1993 a junho de 1997 na região noroeste do Estado de São Paulo, verificaram que em 22 (95,7%) dos 23 surtos ocorridos, a salmonela foi veiculada por alimentos que continham ovos. O consumo de alimentos à base de ovos crus foi responsável por 20 desses surtos (87,0%), enquanto à cocção insuficiente de ovos inteiros e o consumo de alimento cozido (nhoque) foi a causa dos outros dois surtos (8,7%). Ao analisar 12 amostras de ovos que foram utilizados para elaboração dos alimentos envolvidos nestes surtos, em cinco amostras (41,7%) foram isoladas linhagens de *Salmonella* spp.

Oliveira e Silva (2000) detectaram a presença de *S. Enteritidis* em 9,6% das cascas e 3,2% das gemas de ovos coletados no comércio varejista de Campinas (SP), no período de janeiro a março de 1995. Porém, Baú et al. (2001), analisando amostras de ovos produzidos em granjas e em pequenas propriedades da cidade de Pelotas (RS), não encontraram nenhuma amostra positiva para salmonela nas cascas e nos conteúdos desses ovos.

Da mesma forma, Radkowski (2001), na Polônia, avaliou 1.200 ovos coletados em 40 supermercados e não detectou a presença de *Salmonella* spp. tanto na superfície da casca quanto no conteúdo dos ovos. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2004), em conteúdos de ovos comercializados em Maceió (AL). Carvalho et al. (2006) também não observaram a

presença de *Salmonella* spp. em gemas de ovos adquiridos com, no máximo, cinco dias de comercialização.

Em extenso estudo de 115 surtos alimentares por SE ocorridos na região de Campinas (SP), que engloba 87 municípios, Simões et al. (2001) mostraram que ovos, seus derivados e pratos contendo ovos mal cozidos, foram os principais responsáveis pelos surtos, destacando a maionese caseira, com 57% dos casos, seguido pela cobertura de bolos, com 15%. Nesse estudo, 807 pessoas ficaram doentes, com 5 óbitos. Esses são apenas os surtos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através de encaminhamento da Vigilância Sanitária dos respectivos municípios.

Andrade et al. (2004), analisando ovos comercializados em supermercados, feiras livres, postos de venda e granjas de Goiânia (GO), observaram a presença de *Salmonella* spp. em 4,46% das amostras analisadas.

Silva et al. (2004) não encontraram amostra positiva para *Salmonella* spp. nas cascas e nos conteúdos de ovos de diversos fornecedores distintos em Maceió/Alagoas. Resultado semelhante foi encontrado por Carvalho et al. (2006) que também não observaram a presença de *Salmonella* spp. em gemas de ovos adquiridos com, no máximo, cinco dias de comercialização.

Klein (2010), pesquisando *Salmonella* spp. em 1.152 ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração, de diferentes distribuidoras do Estado de Minas Gerais, não encontrou nenhuma amostra positiva para este micro-organismo.

Figueiredo (2012), com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos e a utilização de embalagem plástica analisou 1.920 ovos de consumo armazenados por até 125 dias sob

refrigeração. Da mesma forma que Klein (2010), em nenhuma das amostras foi encontrada *Salmonella* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas do conteúdo interno de ovos de consumo foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), no período de junho de 2010 a maio de 2011.

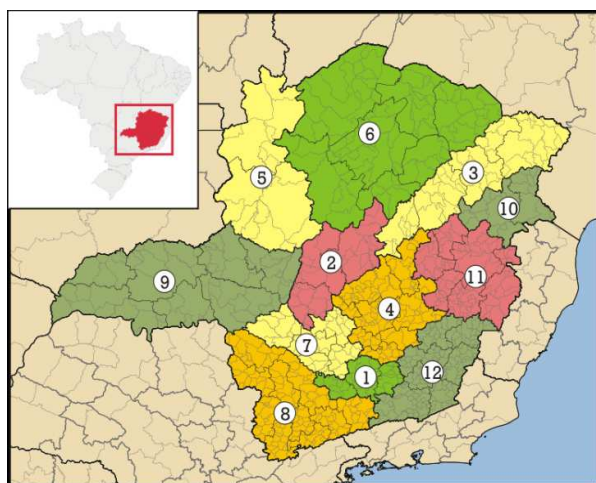
3.1. Amostras

Foram coletadas 168 amostras de ovos de consumo, diretamente das indústrias (indústria de ovos de consumo), pelas coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e coordenadorias

regionais do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do MAPA, localizadas no Estado de Minas Gerais. As amostras de ovos, que permaneceram em temperatura ambiente foram enviadas ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do IMA, localizado na Central de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA Minas), onde foram realizadas as análises microbiológicas.

3.1.1. Estratificação geográfica do Estado de Minas Gerais

Para maior representatividade da amostragem do projeto, o Estado de Minas Gerais foi dividido em doze mesorregiões, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conforme ilustrado na Fig. 1.



	Mesorregião	Microrregião	Municípios
1	Campo das Vertentes	3	36
2	Central Mineira	3	30
3	Jequitinhonha	6	53
4	Metropolitana de Belo Horizonte	8	105
5	Noroeste de Minas	2	19
6	Norte de Minas	7	89
7	Oeste de Minas	5	44
8	Sul e Sudoeste de Minas	10	146
9	Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	7	20
10	Vale do Mucuri	2	23
11	Vale do Rio Doce	7	99
12	Zona da Mata Mineira	7	142

Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista de mesorregiões de Minas Gerais](http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_de_Minhas_Gerais). Acessado em 14 de abril de 2009.

Figura 1. Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos.

Determinadas as mesorregiões, foram verificadas em quais delas existiam indústrias fiscalizadas pelo SIF e pelo SIE, as mesmas foram numeradas e sorteadas aleatoriamente, por mesorregião e por sistema de inspeção. De acordo com a disponibilidade delas por mesorregião em Minas Gerais, foram, então, selecionadas sete indústrias submetidas a fiscalização pelo SIF e SIE para coleta de ovos, conforme descrito na Tab. 2.

Tabela 2. Municípios das indústrias sorteadas por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para ovos

Mesorregião	Sistema de Inspeção	
	Federal	Estadual
Campo das Vertentes	Nepomuceno	Lavras
Metropolitana	Pedro	-
	Leopoldo	-
Oeste de Minas	-	Divinópolis
Sul e Sudoeste	Passa Quatro	Boa Esperança
Triângulo Mineiro	Uberaba	-

Para cada indústria produtora de ovo foram realizadas quatro coletas de amostras durante o período de junho de 2010 a maio

através do levantamento de dados efetuados pelo MAPA e pelo IMA. Uma vez conhecidas as indústrias e suas localizações, de 2011, uma coleta em cada estação do ano. Foram coletados 672 ovos provenientes de sete indústrias distintas. Em cada coleta foram amostrados quatro ovos de seis lotes de produção iguais (seis repetições compostas por um *pool* de quatro ovos), totalizando 168 amostras (seis repetições x quatro estações x sete indústrias).

3.1.2 Temperatura e pluviosidade das mesorregiões avaliadas

Com o objetivo de avaliar as respostas microbiológicas encontradas, foram coletados dados referentes às médias de precipitação pluviométrica (mm), assim como temperatura máxima e mínima (°C) por estação do ano e por mesorregião. Os dados foram referentes ao período de maio de 2010 a junho de 2011, período em que ocorreram as coletas (Brasil, 2013).

Os dados de precipitação pluviométrica das mesorregiões por estação durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações do ano (média de precipitação – 2010/2011)			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Sul e Sudoeste	23,13	193,97	184,43	114,83
Campo das Vertentes	16,37	163,43	247,13	129,77
Oeste de Minas	7,37	175,37	199,97	173,00
Metropolitana	4,87	228,07	225,90	146,07
Triângulo Mineiro	8,60	205,13	233,03	310,37
Média	12,07	193,19	218,09	174,81

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

É possível observar que o inverno apresentou menor precipitação pluviométrica e o verão foi a estação em que houve maiores médias de precipitação.

Os dados de temperatura máxima e mínima das mesorregiões por estação durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 4.

Tabela 4. Temperaturas máxima e mínima por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações (média °C – 2010/2011)							
	Inverno		Primavera		Verão		Outono	
	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
Sul e Sudoeste	25,07	14,70	25,17	14,27	28,03	17,50	25,07	14,70
Campo das Vertentes	25,20	11,80	27,43	15,90	29,87	19,00	26,97	16,4
Oeste de Minas	27,47	10,13	29,57	16,60	31,43	19,33	28,80	16,07
Metropolitana	25,50	15,20	27,60	17,63	29,47	20,03	26,90	18,43
Triângulo Mineiro	29,40	12,97	31,33	17,87	31,03	19,97	29,37	17,10

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

3.2 Variáveis Analisadas

3.2.1 Avaliação microbiológica dos ovos de consumo

As análises microbiológicas realizadas para os ovos de consumo foram:

- contagem global de mesófilos aeróbios (UFC/g);
- contagem de bolores e leveduras (UFC/g);
- contagem de coliformes totais e termotolerantes (UFC/g);
- contagem de *Staphylococcus* spp.;
- pesquisa de *Salmonella* spp.

Inicialmente, os ovos foram imersos em solução de etanol 70% por 15 minutos. Posteriormente, foram secos com gase estéril, quebrados assepticamente e seu conteúdo interno transferido para o interior de um saco plástico estéril, homogeneizados por 60 segundos em homogeneizador tipo Stomacher para posterior realização das análises microbiológicas.

As análises de *Staphylococcus* spp. foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2003a).

Para as análises de micro-organismos mesófilos ($36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h), foi empregada a técnica de Petrifilms™ *Aerobic Count Plate* (3M™, Maplewood, Minnesota, USA), segundo a AOAC (1990). Para a contagem

de micro-organismos mesófilos aeróbios, foram utilizadas sempre as mesmas diluições para todas as amostras de ovos (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Desta forma, foi possível verificar se a diluição influenciaria no crescimento de micro-organismos aeróbios, uma vez que os fatores de proteção naturalmente presentes no ovo também estariam diluídos (Li-Chan e Nakai, 1989).

Para a análise de contagem de coliformes totais e termotolerantes e bolores e leveduras, foi empregada a técnica do NMP, utilizando-se para tanto, o método Simplate™ (AOAC, 2005a e AOAC, 2003).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi empregada a metodologia *Elisa Linked Fluorescent Assay* (ELFA) pelo equipamento Vidas™30 (bioMeriêu, Hazelwood, Missouri, USA) segundo a AOAC (2005c). Para tanto, uma alíquota da amostra (25 mL) foi adicionada a 225 mL de uma solução de salina peptonada estéril 1% e incubada por 24 h a 35°C . Posteriormente, foi transferido 0,1 mL desta solução para um caldo de enriquecimento específico e incubado por mais 24 h, à temperatura de 41°C . Após esse período, 0,5 mL da solução foi transferido para barretas específicas para pesquisa de *Salmonella* spp. que foram inseridas no equipamento Vidas™30 para leitura em até 48 minutos.

O sistema Vidas™30 efetua duas leituras de fluorescência pelo sistema óptico para cada análise. A primeira leitura corresponde ao branco antes do contato do substrato com o cone. A segunda leitura é efetuada após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O Valor de Fluorescência Relativo (RFV - relative fluorescence value) é o resultado da diferença das duas medidas. O RFV obtido de cada amostra é interpretado pelo sistema Vidas™30 da seguinte forma:

$$\text{Valor do Teste} = \frac{\text{RFV}_{\text{amostras}}}{\text{RFV}_{\text{calibrador}}}$$

Um resultado com um valor de teste inferior ao valor limiar indica uma amostra que não contém antígenos ou que contém uma concentração de antígenos inferior ao limite da detecção do método, que corresponderá a um resultado negativo.

Para interpretação dos resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos pela técnica ELFA através do sistema Vidas™30 (Fig. 5), foram considerados negativos os resultados cujos valores se apresentassem inferiores a 0,23 RFV, e positivos, os resultados iguais ou superiores a 0,23 RFV.

A barreta analítica é composta por 10 poços cobertos selados por uma fita de alumínio etiquetada. A etiqueta tem um código de barras com informação relativa ao tipo de teste realizado, ao número do lote e a data de validade do produto. No poço 1 se inserem 500 µL da amostra, o poço 2 é o tampão de pré-lavagem (400 µL de TRIS/NaCl, Tween pH 7,6, estabilizante proteico e conservante) e, os poços 3, 4, 5, 7, 8 e 9 são os tampões de lavagem (600 µL de TRIS/NaCl, Tween pH 7,6, conservante). O poço 6 é do conjugado (400 µL de anticorpos anti-antígenos específicos marcados com fosfatase alcalina e conservante). Por último, o poço 10 é a mini cuba de leitura com

substrato (300 µL de 4-metil-umbeliferil fosfato, dietanolamina e conservante). O cone, que é uma estrutura em formato de cone furado nas duas extremidades, está internamente sensibilizado pelo anticorpo específico para a análise em questão. Em cada cone, em seu diâmetro mais largo, está uma etiqueta selante que identifica o tipo de análise. Este cone, com a ajuda do sistema de vácuo do aparelho, suga a amostra do primeiro poço e perfura cada poço subsequente para jogar a amostra e aspirar a mesma, a fim de que faça com que ela entre em contato com cada poço da barreta para leitura final no poço 10 (Fig 2).

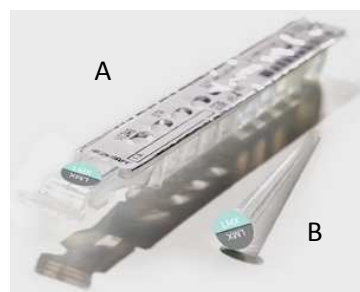


Figura 2. Barreta (A) e cone para o emprego no sistema Vidas™30 (B).

De forma a minimizar as possíveis variações e erros de contagens analíticas, para todos os ensaios, foram efetuados os controles de qualidade dos diluentes, vidrarias e meios de cultura empregados.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a avaliação das mesorregiões em relação às estações do ano, as análises microbiológicas do conteúdo interno dos ovos de consumo foram conduzidas como um delineamento inteiramente ao acaso (DIC) em arranjo fatorial 7 x 4 (sete indústrias x quatro estações) sendo seis repetições por tratamento. Cada repetição era composta por quatro ovos.

Para a avaliação das variáveis microbiológicas foi realizada a transformação de dados e aquelas que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%, segundo Sampaio (2002). Algumas variáveis microbiológicas também foram discutidas através de análises estatísticas descritivas devido a ausência ou baixo número de amostras positivas observadas no experimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos de consumo

Dentre as 168 amostras do conteúdo interno de ovos analisadas, 100% apresentaram

contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios (Tab 5). Para esta análise não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre as estações do ano e nem entre as mesorregiões do Estado de Minas Gerais. Das amostras analisadas, 11,73% encontravam-se com valores acima de $5,0 \times 10^4$ UFC/g (resultados entre $5,0 \times 10^4$ UFC/g e $1,3 \times 10^7$ UFC/g). Estes dados foram superiores aos relatados por Aragon-Alegro et al. (2005) que encontraram contagens de até $2,4 \times 10^5$ UFC/g em ovos coletados em uma indústria durante a etapa de quebra.

Observou-se uma tendência de maiores valores de micro-organismos mesófilos aeróbios em ovos na estação do inverno, porém não houve efeito da temperatura ambiente e da pluviosidade na presença desses micro-organismos ($P>0,05$).

Tabela 5. Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos mesófilos aeróbios no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (média UFC/g)				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	$2,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$
Campo das Vertentes	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$9,2 \times 10^1$	$4,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
Oeste de Minas	$5,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^3$	$1,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$
Metropolitana	$1,4 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Triângulo Mineiro	$8,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^3$	$5,3 \times 10^4$
Média	$3,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^2$	$3,8 \times 10^6$	

Foi observado, na rotina analítica de enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios, que à medida que se faziam diluições seriadas, verificava-se um aumento nas contagens destes micro-organismos. Segundo Li-Chan e Nakai (1989), este aumento durante a diluição seriada se deve à diluição das enzimas anti-bacterianas presentes no ovo, promovendo a viabilidade bacteriana no ovo.

Não há referência e nem recomendação sobre contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios para ovos *in natura* em nenhuma legislação atualmente empregada no Brasil, tanto pelo MAPA quanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apenas para ovo integral líquido e para ovo desidratado, recomenda-se uma contagem menor que $5,0 \times 10^4$ UFC/g (Brasil, 1990). Se fossem adotados estes padrões para ovos *in natura*, as

contagens encontradas em todas as mesorregiões, com exceção da mesorregião do Triângulo Mineiro durante as estações do verão e outono, se apresentariam dentro dos padrões estabelecidos. Porém, as mesorregiões Sul e Sudoeste e Oeste de Minas apresentariam, na estação do inverno, altas contagens destes micro-organismos e a mesorregião de Campo das Vertentes apenas no inverno estaria fora dos padrões estabelecidos. A mesorregião do Triângulo Mineiro estaria fora dos padrões durante a primavera e verão.

Klein (2010), ao avaliar a qualidade microbiológica de ovos proveniente de três grandes distribuidoras do Estado de Minas Gerais, observou a presença de 90 amostras positivas (62,5%) para contagem de mesófilos aeróbios em um total de 144 amostras analisadas. Em 68 amostras (47,2%) foram observadas contagens acima do preconizado pela legislação ($5,0 \times 10^4$ UFC/g). Figueiredo (2012) também verificou que 73 amostras (38%), do total de 192 ovos analisados, apresentaram contagens de mesófilos acima dos padrões preconizados pela legislação brasileira para ovo integral líquido.

Como mencionado, os micro-organismos mesófilos aeróbios incluem um grupo capaz de se multiplicar entre 10°C e 45°C, apresentando uma temperatura de

crescimento ótima de 32°C e, portanto, encontram na temperatura ambiente de países de clima tropical condições ótimas para o seu metabolismo. Esse grupo de bactérias é importante, pois inclui a maioria das bactérias contaminantes de alimentos, tanto as deteriorantes como as patogênicas. As primeiras podem causar alterações organolépticas do produto e as outras podem causar danos à saúde do homem. Portanto, os micro-organismos mesófilos aeróbios são considerados bons indicadores de qualidade microbiológica, justificando a necessidade da pesquisa dos mesmos na rotina.

5.2 Contagem de bolores e leveduras em ovos de consumo

Das amostras analisadas, 113 (67,3%) não apresentaram contagens de bolores e leveduras. Os resultados das análises de contagens de bolores e leveduras encontram-se na Tab. 6. Para esta variável, não houve diferença ($P > 0,05$) entre as mesorregiões do Estado de Minas Gerais, e as estações do inverno, outono e primavera foram semelhantes entre si quanto à contaminação por bolores e leveduras em todas as mesorregiões. Porém, durante o verão, a mesorregião de Campo das Vertentes apresentou contagem de bolores e leveduras mais elevada que as contagens encontradas para as estações da primavera e inverno e semelhante à da estação do outono ($P < 0,05$).

Tabela 6. Contagens médias (UFC/g) de bolores e leveduras no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	ND b	$1,0 \times 10^3$ b	$5,0 \times 10^2$ b	ND b
Campo das Vertentes	ND b	$1,0 \times 10^3$ a	$5,0 \times 10^2$ ab	ND b
Oeste de Minas	ND b	$1,0 \times 10^3$ b	$1,0 \times 10^3$ b	ND b
Metropolitana	ND b	$1,0 \times 10^3$ b	ND b	ND b
Triângulo Mineiro	ND b	$1,0 \times 10^3$ b	ND b	ND b

ND: não detectado ($< 1,0 \times 10^0$ UFC/g)

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Durante o inverno, não foram encontrados resultados positivos para bolores e leveduras em ovos de consumo em nenhuma das mesorregiões estudadas. Na estação da primavera e no outono, ovos provenientes das mesorregiões Metropolitana e Triângulo Mineiro também não apresentaram presença detectável destes micro-organismos. Da mesma forma, nas mesorregiões do Campo das Vertentes e Oeste de Minas, não houve crescimento de bolores e leveduras na estação da primavera. As médias entre as mesorregiões variaram entre $2,5 \times 10^2$ UFC/g e $8,0 \times 10^2$ UFC/g. A estação do verão foi a estação que apresentou contagens em todas as mesorregiões.

Alguns autores relatam a presença de bolores e leveduras em ovos, sempre relacionadas a condições de estocagem inadequadas e à integridade do ovo (Fraga et al., 2007; Magalhães, 2007). Klein (2010) encontrou três amostras positivas para estes micro-organismos em 144 amostras analisadas em Minas Gerais, sendo duas armazenadas em temperatura ambiente e uma em temperatura de refrigeração. Porém, Figueiredo (2012) não encontrou nenhuma amostra positiva em 192 analisadas durante 124 dias de armazenamento sob refrigeração.

As contagens superiores encontradas na mesorregião do Campo das Vertentes na estação do verão podem ser explicadas pela alta pluviosidade e altas temperaturas deste período. Esta mesorregião apresentou as maiores médias pluviométricas entre as demais mesorregiões e temperaturas que variaram entre $27,6^\circ\text{C}$ até $31,1^\circ\text{C}$. Os bolores e leveduras são micro-organismos ubíquos, capazes de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura, sendo observado o seu desenvolvimento em temperaturas entre 5°C até 37°C (Silva et al., 2007). Desta forma, dependendo das condições de estocagem e manejo, não é

incomum observar a presença destes micro-organismos na superfície dos ovos sem, no entanto, afetar consideravelmente o conteúdo interno dos mesmos. Silva et al. (2013) demonstraram que ovos embalados em condições de vácuo parcial, independentemente do tipo de higienização, apresentaram maiores contagens de bolores e leveduras na superfície externa dos ovos. Magalhães (2007) observou que a casca não íntegra favorece o desenvolvimento de bolores e leveduras e que ovos embalados em filme plástico apresentaram menores contagens que os não embalados desta forma. Considerando estes aspectos, a presença de bolores e leveduras em ovos pode ser um bom indicador de condições inadequadas de manejo (estocagem em condições de umidade e altas temperaturas).

A legislação atualmente empregada no Brasil não faz nenhuma referência ou exigência com relação a presença de bolores e leveduras em ovo *in natura*, apenas o RIISPOA referencia, em seu artigo nº 733 (Brasil, 1997), determinando que a presença de fungos no interior ou exterior dos ovos é uma condição que torna o produto impróprio para o consumo. Mesmo sem a exigência de sua pesquisa pela legislação, é importante ressaltar que os bolores e leveduras podem causar deterioração em alimentos e, portanto, devem ser considerados nos programas de garantia de qualidade e segurança alimentar das indústrias alimentícias (Franco e Landraf, 2008). Baseado neste aspecto e de acordo com os índices encontrados nas análises de bolores e leveduras no conteúdo interno dos ovos produzidos e comercializados no Estado de Minas Gerais, observa-se a necessidade de adoção de medidas de controle destes micro-organismos, desde a granja, até os pontos de venda, e a inclusão da pesquisa destes micro-organismos na rotina da fiscalização como mecanismo de avaliação das condições higiênico-sanitárias de produção.

5.3 Contagens de coliformes a 35°C e a 45°C em ovos de consumo

Os resultados das análises de contagem de coliformes a 35°C e a 45°C são apresentados na Tab. 7. Para esta variável, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os parâmetros analisados entre as mesorregiões e entre as diferentes estações do ano. Das amostras analisadas, 158 delas (94%) apresentaram contagens negativas para coliformes a 35°C. Na estação do outono, não foram encontrados resultados positivos para coliformes a 35°C. Nas mesorregiões Sul e Sudoeste e Oeste de Minas foram encontrados resultados positivos para coliformes a 35°C apenas na estação do inverno. A mesorregião do Campo das Vertentes apresentou contagens na primavera e no verão. Para as análises de coliformes a 45°C, apenas no verão e nas mesorregiões do Campo das Vertentes e

Triângulo Mineiro foram encontrados resultados positivos (três amostras positivas). Em nenhuma outra estação e mesorregião foram encontrados resultados positivos para coliformes termotolerantes.

Segundo a legislação (Brasil, 1990), o ovo integral líquido deve apresentar ausência de coliformes termotolerantes (coliformes a 45°C). Neste caso, encontraríamos três amostras fora do padrão da legislação, porém, a legislação para ovos *in natura* não faz referência para este parâmetro.

Foi possível observar uma grande variação de resultados de coliformes a 35°C e a 45°C nos trabalhos encontrados na literatura. Provavelmente, esta variação ocorre devido às diferentes origens dos ovos, do tipo de comercialização, das condições higiênicas e das condições de armazenamento dos mesmos.

Tabela 7. Contagens médias (UFC/g) de micro-organismos coliformes a 35°C e a 45°C no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)								Média	
	Primavera		Verão		Outono		Inverno			
	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C
Sul e Sudoeste	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,0 x 10 ²	ND	2,6 x 10 ¹	ND
Campo das Vertentes	0,5 x 10 ⁰	ND	0,5 x 10 ⁰	0,5 x 10 ⁰	ND	ND	ND	ND	0,3 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰
Oeste de Minas	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2 X 10 ²	ND	3,0 x 10 ⁰	ND
Metropolitana	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Triângulo Mineiro	ND	ND	2,7 x 10 ⁰	0,7 x 10 ⁰	ND	ND	ND	ND	0,7 x 10 ⁰	0,2 x 10 ⁰
Média	0,1 x 10 ⁰	ND	0,6 x 10 ⁰	0,2 x 10 ⁰	ND	ND	4,6 x 10 ¹	ND		

ND: não detectado ($< 1,0 \times 10^0$ UFC/g)

Cardoso et al. (2001), observaram presença de coliformes totais em 33,3% e de coliformes termotolerantes em 8,33% dos ovos comerciais de vários fornecedores da região de Descalvado, em São Paulo. Já Klein (2010) encontrou 20,14% de amostras

positivas para coliformes totais e 1,38% para coliformes termotolerantes durante os 21 dias de armazenamento dos ovos de diferentes distribuidoras de Minas Gerais. De acordo com Frazier (1993), o índice de coliformes a 35°C é empregado para avaliar as condições sanitárias, sendo que altas

contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificações deficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem. A pesquisa de coliformes a 45°C fornece informações sobre condições higiênicas do produto e é a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. Os resultados encontrados neste trabalho mostram a boa condição higiênica dos ovos produzidos e

comercializados nas mesorregiões avaliadas no Estado de Minas Gerais.

5.4 Contagem de *Staphylococcus* spp. em ovos de consumo

Os resultados das análises de contagem de *Staphylococcus* spp. são apresentados na Tab. 8. Das 168 amostras analisadas, em 158 (94%) não foram detectados estes micro-organismos.

Tabela 8. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* spp. no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	ND	0,8 x 10 ⁰	0,3 x 10 ⁰	0,8 x 10 ⁰	0,5 x 10 ⁰
Campo das Vertentes	ND	0,1 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰	ND	0,1 x 10 ⁰
Oeste de Minas	ND	ND	ND	0,2 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰
Metropolitana	ND	0,3 x 10 ⁰	ND	ND	0,1 x 10 ⁰
Triângulo Mineiro	ND	1,2 x 10 ¹	ND	ND	3,1 x 10 ⁰
Média	ND	2,7 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰	0,2 x 10 ⁰	

ND: não detectado (< 1,0 x 10⁰ UFC/g)

Não houve diferença (P>0,05) entre as estações do ano para *Staphylococcus* spp. sendo que, na estação da primavera, não se detectou este micro-organismo em nenhuma mesorregião. A mesorregião do Campo das Vertentes também não apresentou contagens na estação do inverno. As amostras da mesorregião de Oeste de Minas não apresentaram contagem para esta bactéria, nem no verão e nem no outono, e nas mesorregiões Metropolitana e Triângulo Mineiro não foi verificada a presença deste micro-organismo nas estações do outono e inverno.

Em todos os casos, as contagens verificadas para estafilococos foram muito baixas, apresentando contagens médias que variaram entre 0,1 x 10⁰ UFC/g a 2,7 x 10⁰ UFC/g. Das dez amostras positivas (6,3% de

158) para *Staphylococcus* spp., apenas duas (20%) eram de *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo que as demais (80%) eram coagulase negativo (Tab. 9). Uma amostra positiva para *Staphylococcus* coagulase positivo era proveniente da mesorregião Metropolitana e, a outra, era proveniente da mesorregião do Campo das Vertentes, sendo as suas ocorrências observadas no verão.

A pesquisa de *Staphylococcus* spp. em ovos limita-se apenas aos ovos integrais líquidos e desidratados, para os quais é exigida a ausência deste micro-organismo em 1 g de produto (Brasil, 1990). A exigência rigorosa sobre a ausência deste micro-organismo é desejável e pode ser justificada pelo fato de que o ovo (*in natura*, líquido ou desidratado) é empregado na elaboração de diversos alimentos como ingrediente e que estes

produtos alimentícios poderão não sofrer tratamento térmico. Sendo o ovo um produto rico em nutrientes, se a carga microbiana estiver presente em níveis críticos, a probabilidade do seu desenvolvimento e multiplicação aumenta e, conseqüentemente, aumenta o risco sobre produção de

enterotoxinas, gerando, desta forma, riscos sobre o consumo deste alimento.

Os baixos índices de *Staphylococcus* spp. não podem ser justificados pela temperatura ambiente ou pela umidade em função da precipitação pluviométrica.

Tabela 9. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase positivo e coagulase negativo no conteúdo interno de ovos produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)								Média	
	Primavera		Verão		Outono		Inverno			
	coag+	coag -	coag+	coag -	coag+	coag -	coag+	coag -	coag+	coag -
Sul e Sudoeste	ND	ND	ND	0,8 x 10 ⁰	ND	0,3 x 10 ⁰	ND	0,8 x 10 ⁰	ND	0,5 x 10 ⁰
Campo das Vertentes	ND	ND	0,1 x 10 ⁰	ND	ND	0,1 x 10 ⁰	ND	ND	0,1 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰
Oeste de Minas	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2 x 10 ⁰	ND	0,04 x 10 ⁰
Metropolitana	ND	ND	0,3 x 10 ⁰	ND	ND	ND	ND	ND	0,1 x 10 ⁰	ND
Triângulo Mineiro	ND	ND	ND	1,2 x 10 ¹	ND	ND	ND	ND	ND	3,1 x 10 ⁰
Média	ND	ND	0,1 x 10 ⁰	2,6 x 10 ⁰	ND	0,1 x 10 ⁰	ND	0,2 x 10 ⁰		

ND: não detectado (< 1,0 x 10⁰ UFC/g)

Observa-se que as estações que apresentaram contagens, mesmo que pequenas, foram as estações do verão, outono e inverno.

Os valores das contagens de *Staphylococcus* encontrados neste trabalho são semelhantes aos encontrados por Aragon-Alegro et al. (2005) que não observaram a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras coletadas em indústria de processamento. Porém, diferem dos dados encontrados por Klein (2010) e Figueiredo et al. (2013) que verificaram a presença em 11,8% e 11,7% respectivamente das amostras de ovos comercializadas no Estado de Minas Gerais.

Estes baixos índices verificados nas análises de *Staphylococcus* spp. mostram que a qualidade higiênica e sanitária do conteúdo interno dos ovos produzidos e

comercializados no Estado de Minas Gerais é satisfatória. No entanto, não exclui a necessidade da sua pesquisa como rotina dos processos de fiscalização.

5.5 Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos de consumo

Os resultados das análises de *Salmonella* spp. no conteúdo interno de ovos em todas as mesorregiões estudadas e em todas as estações do ano foram negativos.

Foi observado que a temperatura ambiente em que os ovos foram coletados e manipulados, assim como a precipitação pluviométrica nas diferentes mesorregiões não influenciaram no desenvolvimento de *Salmonella* spp. nos ovos de consumo, uma vez que, nas mais variadas temperaturas e

umidade, não foi observada nenhuma amostra positiva.

De acordo com Keller et al. (1995), fatores como anticorpos, enzimas antibacterianas, sequestro de ferro e proteínas inibidoras de proteases bacterianas presentes na gema e albúmen são capazes de controlar a contaminação dos ovos por *S. Enteritidis* antes da completa formação da casca e postura dos ovos. Barros et al. (2001) também atribuíram a ausência de *S. Enteritidis* no interior de todo o conteúdo do ovo (albúmen e gema), após sua imersão em solução contendo essa bactéria, a estes fatores antibacterianos encontrados no albúmen. Porém, Oliveira e Silva (2000), em experimento semelhante, mas analisando isoladamente a gema, constataram a contaminação por *S. Enteritidis* proveniente da casca a partir de 24h após a contaminação artificial.

Segundo Humphrey (1997), a contaminação de ovos por *Salmonella* spp. geralmente é baixa, próxima de 1%. A ausência de *Salmonella* spp. em ovos foi observada por outros autores. Baú et al. (2001), ao analisarem 46 amostras de ovos produzidos em granjas e 48 amostras de ovos produzidos em pequenas propriedades e comercializados em supermercados e feiras livres da cidade de Pelotas (RS) não encontraram nenhum resultado positivo para *Salmonella*. Radkowski (2001), na Polônia e Silva et al. (2004), em Maceió (AL) também não encontraram amostra positiva para

Salmonella spp. nas cascas e nos conteúdos de ovos de diversos fornecedores distintos. Carvalho et al. (2006) também não observaram a presença de *Salmonella* spp. nas gemas de 432 ovos de quatro linhagens diferentes (Babcock B 300, Hy Line W-36, Lohman White e Hisex) e de três idades (29, 60 e 69 semanas), oriundos da mesma granja. Klein (2010), ao avaliar a qualidade microbiológica de ovos provenientes das três principais distribuidoras do Estado de Minas Gerais, também não observou a presença de *Salmonella* spp. Figueiredo (2012) e Figueiredo et al. (2013) não observaram a presença de *Salmonella* spp. em ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que a qualidade microbiológica dos ovos de consumo produzidos e comercializados no Estado de Minas Gerais pode ser considerada boa, pois, as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Staphylococcus* spp., coagulase positivo e coagulase negativo, no conteúdo interno dos ovos foram consideradas baixas, além de não ter sido detectada a presença de *Salmonella* spp. nos ovos.

CAPÍTULO II. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CARCAÇAS DE FRANGO PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A carne de frango é, para o consumidor brasileiro, uma das mais baratas fontes de proteína animal disponíveis no mercado, sendo apenas 2,8% mais cara que uma dúzia de ovos e 117,2% mais barata que um quilo de acém, uma das carnes vermelha mais barata do mercado. Assim sendo, a carne de frango é, juntamente com o ovo, a fonte de proteína animal de menor custo, além de ser uma das carnes com menor teor de lipídios (Oliveira et al., 2011).

A carne de frango é rica em ferro e vitaminas do complexo B, em especial niacina no músculo escuro e riboflavina no músculo claro. Saudável, essa carne apresenta alto teor de proteínas de boa qualidade, fontes de aminoácidos essenciais. É recomendada para consumo em todas as idades e contém uma baixa taxa de colesterol. A carne do peito contém apenas 2% de lipídios (maior parte da gordura está na pele e vísceras), além de trazer gorduras de boa qualidade, visto que se trata em grande parte de gorduras insaturadas (Coutinho, 2007; Venturini et al., 2007).

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), a carne de aves corresponde às obtidas de aves domésticas de criação (Brasil, 1997). O frango possui carne de coloração branca e fornece nutrientes necessários em dietas equilibradas. Proteínas, lipídios, vitaminas e minerais encontrados na composição da carne variam de acordo com a linhagem, idade e condições higiênicas do animal (Huallanco, 2004; Venturini et al., 2007).

Por ser muito rica em nutrientes, a carne de frango pode ser um importante veículo de transmissão de bactérias de importância para a saúde pública. A maioria dos micro-organismos que alteram a carne fresca refrigerada são bactérias psicrófilas dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, estando também presentes espécies anaeróbias facultativas como enterobactérias psicrófilas *Aeromonas* sp., *Shewanella putrefaciens* e micro-organismos Gram positivo como *Lactobacillus* spp. e *Brochorix thermosphacta*. Além destas, da carne de aves podem ser isoladas bactérias mesófilas como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *S. aureus*, *E. coli* enterohemorrágica e ainda *L. monocytogenes* responsáveis por toxinfecções alimentares (Oliveira et al., 2011).

A contaminação de carcaças de frangos de corte tem importantes implicações para a segurança e o tempo de prateleira do produto. Os micro-organismos oriundos dos produtos de origem animal procedem de sua microbiota superficial, de suas vias respiratórias e do trato intestinal. O trato intestinal das aves, principalmente de galinhas e perus, é um dos principais reservatórios naturais de micro-organismos patogênicos como a *Salmonella*. A incidência e a quantidade desses micro-organismos, presentes na carne varia de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (Board e Fuller, 1994; Bourgeois et al., 1994; Freitas et al., 2004).

Para carnes resfriadas ou congeladas *in natura* de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou em cortes), a RDC nº12/2001 estabelece o limite máximo permitido para coliformes termotolerantes de $1,0 \times 10^4$ UFC/g, sendo que nenhum outro parâmetro é exigido (Brasil, 2001).

Um dos requisitos para exportação direcionada à África do Sul se refere também à *Salmonella*. Para exportação, preconiza-se a certificação relativa à ausência de *S. enteritidis* e *S. typhimurium*. Para produto final, só são definidos critérios microbiológicos para frango cozido, e são eles: pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E.coli* spp., *S. aureus* e *Clostridium perfringens* (ausência em 20 g) além de contagem bacteriana total ($< 1,0 \times 10^4$ UFC/g) (África, 1991).

O Regulamento de inspeção de produtos de carne de aves nos EUA estabelece que todo estabelecimento oficial que abate aves deve analisar a presença de *E. coli* biotipo 1 e *Salmonella* spp. em amostras recolhidas de acordo com o plano de amostragem (USDA, 2003).

No caso da União Européia, também é exigida a pesquisa de *Salmonella* spp., através do Regulamento CE nº2073/2005 de 15 Novembro de 2005 (União, 2005).

No Canadá, em amostras de frango pré-cozidos são exigidas as pesquisas *Salmonella* spp., *C. jejuni*, *C. coli* e *Yersinia enterocolitica* sendo esperada a ausência destes micro-organismos no produto. No caso de contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, *E. coli* e *S. aureus*, a tolerância é de 10^6 UFC/g, 10^3 UFC/g e 10^4 UFC/g respectivamente (Canadian, 2011a).

A legislação na Arábia Saudita exige que o frango congelado destinado à exportação deve ser submetido a testes de *Salmonella*

spp., cujo resultado deve ser negativo (Arábia Saudita, 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos de importância em carcaças de frango de corte

2.1.1 Coliformes em carcaças de frangos de corte

Os coliformes são micro-organismos de grande importância na produção de carcaças de frangos, pois são responsáveis por grande número de contaminações e são bons indicadores da qualidade dos processos higiênicos e tecnológicos de produção. Leite e Franco (2006) analisaram 30 amostras de frango obtidas de estabelecimentos, com ou sem inspeção, que comercializam carnes no Rio de Janeiro e pesquisaram coliformes termotolerantes e *E. coli*. Os pesquisadores observaram que 12 das 30 amostras (40%) apresentaram contaminações inferiores a $2,9 \times 10^7$ UFC/g. Das 150 colônias isoladas, 18 (12%) eram *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) de 15 estabelecimentos distintos. Não foi detectada a presença de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) nas amostras analisadas de todos os estabelecimentos.

Lopes et al. (2007) realizaram um experimento no qual 60 amostras de frango foram coletadas diretamente da nória antes da entrada no pré-chiller e 60 outras amostras no chiller, e pesquisaram a presença de coliformes. Os resultados encontrados, em médias logarítmicas de coliformes totais nas carcaças de frango, variaram de 3,24 NMP/g a 4,04 NMP/g antes da entrada no chiller. A variação de coliformes nas carcaças de frango que saíram do pré-chiller foi de 1,85 NMP/g a 3,69 NMP/g. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as médias logarítmicas do número mais provável

(NMP) de coliformes totais em relação a entrada e a saída dos tanques, em um mesmo dia de coleta.

Com o objetivo de traçar o perfil microbiológico de carcaças de frangos de corte de diferentes pesos (médias de 1.200 g e 2.100 g), Maroso (2008) coletou 100 carcaças de frangos (com os pesos médios mencionados) em um abatedouro localizado no Estado do Rio Grande do Sul (dois grupos de 50) e concluiu que a maioria das amostras analisadas apresentou condições apropriadas de consumo, uma vez que os números de contagem bacteriana para coliformes totais e coliformes termotolerantes se encontravam dentro dos limites permitidos na legislação para os diferentes pesos de carcaças.

Pires et al. (2009) avaliaram a presença de coliformes termotolerantes em carcaças de frango *in natura* provenientes de 24 estabelecimentos cadastrados pela Vigilância Sanitária de Recife, e verificaram, em 100% das amostras, a presença de colônias de coliformes termotolerantes. Porém, nenhuma das amostras analisadas apresentava valores fora dos padrões estabelecidos na RDC n° 12/2001 (Brasil, 2001). Desta maneira, os autores concluíram que as amostras, mesmo positivas, encontravam-se aptas para o consumo.

Penteado e Esmerino (2011) desenvolveram um trabalho no qual avaliaram as condições higiênico-sanitárias de cortes de frangos resfriados, comercializados em cinco pontos de venda no município de Ponta Grossa (PR). Foram analisadas 50 amostras de dez lotes no período de março a maio de 2008. As análises microbiológicas realizadas foram: determinação do NMP de coliformes totais, coliformes a 45°C/g e pesquisa de *E. coli* e *Enterococcus* spp. Observaram uma contaminação de origem fecal máxima de

6,5 x 10² NMP/g, dentro, portanto, dos padrões estabelecidos pela legislação atual. Desta forma, consideraram que as contagens de micro-organismos inferiores àquelas estabelecidas na legislação vigente atestaram uma boa qualidade higiênico-sanitária para a carne de frango comercializada na cidade.

2.1.2 *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli é um micro-organismo pertencente ao filo *Proteobacteria*, classe *Gamaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales* e família *Enterobacteriaceae* (Euzéby, 2012). A *E. coli* O157: H7 é um coliforme que faz parte do grupo das *E. coli* produtoras de toxinas tipo *Shiga* (STEC). São conhecidas como STEC as linhagens de *E. coli* capazes de produzir, no mínimo, uma das citotoxinas conhecidas como toxinas tipo *shiga* (ou *shiga like toxin*). As STEC também são chamadas de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VT). O nome toxina tipo *shiga* (Stx) se dá pela familiaridade com as citotoxinas produzidas pela *Shigella dysenteriae* sorotipo 1 e VT baseado na citotoxicidade para as células Vero. O grupo de STEC que causa colite hemorrágica (CH) e síndrome urêmica-hemolítica (SHU) é chamado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Konowalchuck et al., 1977; O'Brien et al., 1982; Levine et al., 1987).

A maioria das linhagens de *E. coli* O157:H7 não é capaz de fermentar o sorbitol e não produzem β-glucuronidase. Apesar disso, algumas linhagens de *E. coli* O157:H7 com capacidade de fermentar sorbitol já foram associadas à CH e SHU na Alemanha (Besser et al., 1999).

E. coli O157:H7, que é assim denominada por ter o 157° antígeno somático (O) identificado como o 7° antígeno flagelar (H), foi primeiramente identificada como patógeno em 1983 nos EUA, devido à

diarreia sanguinolenta que afetou 47 pessoas que consumiram hambúrgueres contaminados. A partir de então, este patógeno passou a ter um grande destaque na saúde pública (Bertão e Saridakis, 2007; Teixeira, 2008).

Através da biologia molecular, foi possível determinar que STEC (O157:H7) evoluiu de linhagens de EPEC, que adquiriram genes para a produção de toxina tipo *shiga*. Esse processo provavelmente ocorreu quando, ao infectar *Shigella* sp., o fago adquiriu esse gene e, depois, o transferiu para EPEC, resultando em um micro-organismo virulento (Besser et al., 1999).

Dentre as toxinas tipo *shiga* conhecidas (Stx1 e Stx2), considera-se que a molécula Stx1 é uma estrutura altamente conservada e é idêntica à *shiga* toxina da *S. dysenteriae* tipo 1. Existem diversas variantes antigênicas de Stx2, chamadas de Stx2c, Stx2d, Stx2d-ativável, Stx2e e Stx2f, que diferem na sua atividade biológica e na associação com doenças. O receptor das Stx se localiza nas células da mucosa intestinal humana e na superfície das células epiteliais dos rins e é conhecido como globotriacilceramida (GB3), sendo este o determinante primário para a susceptibilidade à injúria tissular. Devido à falta desses receptores no trato gastrointestinal dos bovinos, a colonização por EHEC nos mesmos é assintomática. Quanto à toxicidade, Stx2 é mil vezes mais tóxica para as células do endotélio microvascular renal humano do que a Stx1, provando que a associação do gene *eae* e Stx2 no STEC isolado é considerado preditor de SHU (Louise et al., 1995; Boerlin, 1999; Ethelberg et al., 2004; Gyles, 2007).

Amostras de STEC têm sido isoladas de diversos animais, como bovinos, ovinos, suínos, veados, cavalos, cães e pássaros

sendo que, na América do Norte, o principal reservatório de STEC são os bovinos. Já na Austrália são os ovinos, dos quais já foram isolados mais de 100 sorotipos de STEC. Em bovinos, já foram encontrados mais de 435 sorotipos nas concentrações de 10^2 a 10^5 UFC/g de fezes. Apesar de já ter sido isolada de suínos, os sorotipos de STEC usualmente detectados são específicos para essa espécie e associados à doença do edema (Beutin et al., 1993; Cambell et al., 2001; Bettelheim et al., 2003; Cookson et al., 2006).

E.coli O157:H7 pode colonizar o ceco do frango, sendo excretada nas fezes por vários meses, apesar de esse micro-organismo não fazer parte da microbiota do trato gastrointestinal das aves (Beery et al., 1985). Este fato foi confirmado por Chapman et al. (1997), que avaliaram a presença de *E.coli* O157 em 1.000 amostras de suabe do reto de frangos, logo após o abate, durante o período de um ano.

Diversas são as fontes de contaminação pelos seres humanos. A ingestão de alimento como carne, salsicha, leite cru, queijo, suco de maçã não pasteurizado, alface, melão, rabanete e água contaminados ou através do contato direto com os animais são frequentemente relatados. A transmissão também pode ocorrer de pessoa para pessoa através de água e fômites contaminados por fezes (Gyles, 2007).

Esse micro-organismo tem mostrado capacidade de anexar, colonizar e formar biofilmes em uma variedade de superfícies. A fixação de bactérias, colonização e formação destes biofilmes em alimentos ou em uma superfície que entre em contato com alimentos, pode servir como fonte para biotransferência ou contaminação cruzada entre produtos. Daí a capacidade da *E. coli* O157:H7 de persistir no ambiente da fazenda, água, solo, sedimentos e carcaça de animais (Uhlich et al., 2006).

A capacidade de *E. coli* O157:H7 de formar biofilme pode ser atribuída ao sinal auto-indutor-2 (AI-2), que são pequenas moléculas produzidas pelas células bacterianas, que atravessam a célula e vão se acumulando no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular. Este AI-2 está envolvido na regulação dos genes da quimiotaxia, síntese flagelar e motilidade. Por meio do mecanismo de comunicação entre as bactérias (*quorum sensing*), estas são capazes de detectar a concentração de auto-indutores e, dessa maneira, perceber o tamanho da população. A partir de uma concentração limite dos auto-indutores, esses sinais servem de co-indutores e passam a regular a transcrição de genes (Rumjanck et al., 2004; Pillai e Jesudhasan, 2006).

Doyle e Schoeni (1987) analisaram, ao todo, 164 amostras de carne moída, 264 de carne suína, 205 de carne de cordeiro e 06 de carne de frango oriundas da seção de carnes refrigeradas de mercados de Madison/EUA e de mercearias de Calgary e Alberta/Canadá. *E. coli* O157:H7 foi isolada de seis (3,7%) amostras de carne moída, quatro (1,5%) de carne suína, quatro (1,5%) de carne de frango e quatro (2%) de carne de cordeiro, o que, de acordo com os autores, indica que essa bactéria está associada a produtos de origem animal e não especificamente à carne bovina.

No Egito, Abdul-Raouf et al. (1996) pesquisaram *E. coli* O157:H7 em 50 amostras de carne bovina moída, 50 amostras de frangos desossados, 25 amostras de carne de cordeiro e 50 amostras de leite de vaca pasteurizado. Essas amostras foram coletadas de matadouros frigoríficos, supermercados e fazendas. *E. coli* O157:H7 foi isolada de três (6%) das amostras de carne bovina moída, duas (4%) das amostras de frango desossado, uma (4%) das amostras

de carne de cordeiro, três (6%) das amostras de leite pasteurizado.

Tutenel et al. (2003) estimaram a prevalência de *E. coli* O157 em 3.625 amostras de carne fresca coletadas pelo serviço de inspeção, durante o período de 1999 a dezembro de 2001, na Bélgica. Foram coletados suabes de carcaça bovina (2452), carcaça de vitelo (147), carcaça suína (85) e carcaça de frango (71). Além dessas carcaças, 549 amostras de carne bovina moída e 203 amostras de peito de frango também foram analisadas. Das 274 amostras de frango, 96 (35%) foram positivas para *E. coli* O157 usando metodologia Ensaio Fluorescente de Enzima Ligada (*Enzyme Linked Fluorescent Assay - ELFA*) automatizada, não sendo confirmada nenhuma linhagem pelo IMS (separação imunomagnética), demonstrando, os autores, a baixa especificidade da metodologia ELFA automatizada para o isolamento de *E. coli* O157.

Akkaya et al. (2006) na Turquia, isolaram *E. coli* O157:H7 de duas (1,1%) das 190 amostras de carcaça de frango fresco coletadas durante o período de abril a julho de 2004.

Chinen et al. (2009) isolaram e caracterizaram linhagens de *E. coli* O157:H7 de hambúrgueres de carne bovina e hambúrgueres de carne de frango, após episódios de infecção notificados em 2001 e 2002, em Buenos Aires. Foram coletadas amostras de 33 estabelecimentos, sendo 150 amostras de hambúrgueres de carne bovina (89 crus e 61 cozidos) e 129 amostras de hambúrgueres de carne de frango (79 crus e 50 cozidos). Nesse mesmo período, os autores coletaram também 39 amostras de carcaça de frango crua congelada, com o objetivo de estabelecer o papel do frango como fonte de contaminação por *E. coli* O157:H7. Para isolamento e caracterização,

foram utilizados, como métodos de triagem, um teste imunocromatográfico e um imunoensaio. Todas as amostras positivas nesses testes de triagem foram testadas pela separação imunomagnética e, em seguida, pela eletroforese em gel de campo pulsado (PGFE). Das 279 amostras de hambúrguer pesquisadas, em 19 (6,8%) foram encontradas 20 linhagens de *E. coli* O157:H7 e, das 39 carcaças de frango, de quatro (10,3%) carcaças foram isolados quatro linhagens de *E. coli* O157:H7. Todas as linhagens de *E. coli* O157:H7 foram caracterizadas como positivas para *eae* e *ehxA* e foram genotipadas como *sx2/sx2c* (12 linhagens - 50%), *sx1/sx2/stx2c* (oito linhagens - 25%), *sx1/stx2c* (três linhagens - 12,5%) e *stc2c* (uma linhagem - 5%).

Com o objetivo de avaliar a presença de *E. coli* em produtos cárneos frescos durante o período de 2004 a 2006 e caracterizar a linhagem isolada quanto ao grupo de virulência e sorotipo, Lee et al. (2009) analisaram 750 amostras de carne bovina, 900 de carne de frango e 1.350 de carne suína, na Coreia. As amostras foram coletadas de plantas de processamento de carne, açougues, lojas de atacado e mercados convencionais. *E. coli* foi isolada em 201 (14,9%) das amostras de carne suína, 41 (4,6%) das amostras de carne de frango, 31 (4,1%) das amostras de carne bovina. Os micro-organismos isolados foram separados em três categorias, de acordo com seus fatores de virulência: 17 ETEC (43,6%), 14 EHEC (35,9%) e 8 EPEC (20,5%). Na carne bovina, linhagens de EHEC foram mais prevalentes (22,6%), ao contrário das carnes de frango e da carne suína nas quais as linhagens de ETEC foram as mais prevalentes. Das 41 amostras de *E. coli* isoladas da carne de frango, dez micro-organismos foram identificados como ETEC (14,6%), EHEC (7,3%) e EPEC (2,4%). Das 14 EHEC categorizadas, nove foram positivas para produção de VT2, duas

positivas para VT1/VT2, duas positivas para VT2/*eaeA* e uma positiva para VT1/*eaeA*. Com relação ao sorogrupo, nenhuma amostra do sorogrupo O157 foi isolada.

Em 2012, um trabalho envolvendo suabe cloacal de frangos de corte de diferentes granjas, amostras de hambúrguer de frango, carcaça de frango e miúdos (fígado, coração, moela e pescoço) foi realizado na Argentina com o objetivo de pesquisar a presença dos genes *eae* e *stx*, que codificam, respectivamente, os fatores de virulência intimina e produção de toxina tipo *shiga*, cujos resultados permitiriam inferir e comparar a contaminação dessas amostras por STEC e EPEC. A amostra foi considerada contaminada por STEC quando isolado o gene *stx*; por EPEC quando o isolado gene *eae* e, por STEC/EPEC, quando isolados os dois genes. Do total de 1.057 amostras de produtos de frango, 5% estavam contaminadas por STEC, 2,4% por STEC/EPEC e 20% por EPEC. Com relação às amostras de hambúrguer, 21% estavam contaminadas com EPEC, 10,3% com STEC e 7,7% com STEC/EPEC. Apesar do isolamento de STEC, nenhuma linhagem de *E. coli* O157:H7 foi isolada, já que não foi detectado o gene *eaey1* (Alonso et al., 2012).

Lima (2012), avaliando a prevalência de *E. coli* O157:H7 em carcaças de frango de corte abatidas no Estado de Minas Gerais, não observou a presença deste micro-organismo em 240 carcaças amostradas, empregando a técnica de qPCR. Da mesma forma nenhuma das amostras analisadas apresentou-se positiva para linhagens produtoras de toxina do tipo shiga.

2.1.3 *Staphylococcus* spp. em carcaças de frangos de corte

Não há nenhuma recomendação ou exigência, por parte dos órgãos fiscalizadores vinculados ao Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sobre a pesquisa de *Staphylococcus* spp. em carcaças de frango. De acordo com a RDC nº 12/2001, para carcaças de aves é estabelecido apenas a pesquisa de coliformes a 45°C (Brasil, 2001).

De acordo com Oliveira (1995), as carnes bovina e de frango foram responsáveis por 47,3% dos surtos de intoxicação estafilocócicas ocorridos nos Estados Unidos entre 1975 e 1982 e, entre 1983 e 1987, 42,2% dos surtos de intoxicação ocorreram pela presença de enterotoxinas nos alimentos.

Capita et al. (2003) e Yashoda et al. (2004) observaram maiores contagens de *S. aureus* em carcaças de frango abatidas artesanalmente e vendidas em feiras e mercados públicos do que nas processadas em abatedouros industriais e comercializadas em supermercados, indicando a importância da implantação de medidas de controle e higiene no processamento de carcaças de frango para obtenção de produtos seguros.

Em um estudo realizado por Carmo et al. (2003), foi observado um surto alimentar envolvendo *S. aureus* ocorrido no município de Passos (MG), onde 31 pessoas foram acometidas apresentando sintomatologia de intoxicação alimentar. Os resultados da investigação epidemiológica revelaram a presença de *S. aureus* na panqueca de frango, sendo este definido como o alimento responsável pela veiculação da toxina causadora da enfermidade.

Freitas et al. (2004), com o objetivo de avaliar as condições microbiológicas de carcaças de frango com relação às contagens de *S. aureus*, analisaram amostras de carcaças *in natura* (comercializadas em mercados públicos) e resfriadas (vendidas

em supermercados) e observaram que em 58 (91,1%) das 61 amostras analisadas foram isolados estafilococos, sendo que 40 (65,0%) apresentaram *Staphylococcus* coagulase positivo e 18 (31,0%) *Staphylococcus* coagulase negativo. As contagens de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo variaram entre 10^1 a 10^6 UFC/g e as carcaças de frango resfriadas apresentaram contagens inferiores de *S. aureus* em relação às carcaças de frango *in natura*, havendo correlação direta entre a temperatura de comercialização do produto e as contagens dessa bactéria.

Um total de 444 amostras de diferentes cortes de frango obtidos de 145 supermercados no Japão foram analisadas por Shimizu et al. (2005) buscando a presença de *S. aureus*. O micro-organismo foi encontrado em 292 amostras (65,8%) de 131 dos 145 supermercados sendo que 21,7% dos micro-organismos isolados possuíam potencial enterotoxigênico. Não foi observada diferença significativa entre os supermercados e entre os tipos de cortes.

Koluman et al. (2011) analisaram 50 amostras de carne de frango comercializadas em supermercados de Ankara (Turquia) e encontraram 52% das amostras contaminadas por *Staphylococcus* spp. sendo que apenas 4% foram consideradas coagulase positivo.

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2011 no Brasil, foram identificados 800 surtos de DTA cujo agente causal foi o *S. aureus*, sendo que destes, 200 envolveram carne de frango (Brasil, 2011). No entanto, as estatísticas sobre a incidência dos eventos associados aos *Staphylococcus* spp. e à carne de frango ainda são pouco conhecidas.

2.1.4 *Salmonella* spp. em carcaças de frangos de corte

Salmonelas estão amplamente distribuídas no ambiente e residem, primariamente, no trato intestinal de aves, répteis, animais de estimação e de produção e, também, no de seres humanos. A transmissão de salmonelas ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados. As fontes mais comuns de salmonelas são carnes (principalmente de frango), leite e ovos. Muitos levantamentos em diferentes países têm mostrado que 30 a 50% das carcaças de frangos congeladas ou refrigeradas estão contaminadas com *Salmonella*. Além destes, diversos alimentos podem ser envolvidos na transmissão, sejam eles crus, insuficientemente processados, mal cozidos ou que sofreram contaminação cruzada (Kerr et al., 1992, Favrin et al., 2001).

Alimentos de origem animal, especialmente os obtidos de aves e alimentos que contenham ovos, como saladas e produtos de confeitaria, têm sido frequentemente envolvidos em surtos de salmonelose em seres humanos. Muitos sorovares de *Salmonella* têm um reservatório animal específico, estando sua transmissão ligada a alimentos obtidos destes animais. Este é o caso de algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis (SE) que têm a capacidade de colonizar o canal ovopositor da galinha, o que pode vir a causar a contaminação da membrana que envolve a gema durante a formação do ovo (Baú et al., 2001).

A contaminação de frangos por *Salmonella* spp. pode estar relacionada com a eliminação da bactéria pelas fezes de aves infectadas que contaminam a cama aviária, além de ratos de granja, como portadores que eliminam o agente por longo período de tempo. Tirolli e Costa (2006) apontam o transporte como importante fonte de

contaminação, visto que, as aves normalmente são confinadas e aglomeradas em caixas por longas distâncias em condições inadequadas no aspecto sanitário, aumentando assim o risco de contrair infecções cruzadas por salmonelas.

O mecanismo de contaminação da carcaça por salmonelas, durante o abate e processamento, envolve inicialmente a retenção destes micro-organismos sobre a pele. Algumas espécies de *Salmonella* são capazes de aderir-se firmemente a fibras de colágeno da superfície externa da pele do frango, após a imersão em água. Desta forma, as operações de abate e processamento das carcaças também contribuem para a disseminação e multiplicação das salmonelas, que podem ocorrer por meio da água de escaldagem, no processo de depenagem, na contaminação cruzada de equipamentos e utensílios, no manuseio inadequado durante o corte e evisceração e no acondicionamento, como à temperatura ambiente até a sua comercialização (Oliveira et al., 2011).

Uyttendaele et al. (1999) pesquisaram 772 carcaças de frango comercializadas nos mercados da Bélgica quanto à presença de *Salmonella* spp. e encontraram uma incidência de 36,5% de contaminação das carcaças. Os autores sugeriram que as exigências quanto às regras de inspeção durante o abate e manipulação devem ser rigorosas, uma vez que a ausência deste micro-organismo ainda não foi obtida.

Santos et al. (2000), analisaram 150 carcaças de frangos congeladas de quatro marcas distintas obtidas no comércio varejista de Jaboticabal (SP), durante os anos de 1996 e 1997 e encontraram a presença de salmonelas em 32% das carcaças analisadas. Das amostras isoladas 60,4% pertenciam ao sorovar *S. Enteritidis*.

Fuzihara et al. (2000) encontraram salmonelas em 42% das amostras de carcaças de frangos oriundas de 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá (SP), e 30% destas amostras positivas para salmonela foram identificadas como pertencentes ao sorovar *Salmonella* Enteritidis.

Mateus et al. (2003) pesquisaram a presença de *Salmonella* em 102 amostras de frango coletadas no período de abril de 1996 a agosto de 1999 no comércio varejista de Baurú (SP). Os autores encontraram seis amostras positivas (5,9%) e, destas, quatro eram *Salmonella* Enteritidis.

Lapidot et al. (2006) estudaram a formação de biofilme de *Salmonella* spp. como fonte de contaminação de alimentos e observaram que após uma semana, o biofilme instalado desempenhava um importante papel na adesão inicial e sobrevivência deste micro-organismo no ambiente, inclusive após desinfecção com substância clorada. Este biofilme oferece risco de contaminação cruzada com outros alimentos, mostrando o risco da manutenção do biofilme em superfícies de processamento de alimentos.

Duarte et al. (2009) verificaram a ocorrência de *Salmonella* em 260 carcaças de frango de cinco diferentes abatedouros localizados no noroeste do Brasil, no período de abril a dezembro de 2004. Das carcaças analisadas, 25 (9,6%) foram positivas para *Salmonella* sendo que *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar predominante.

Um estudo feito em 23 cidades da Colômbia por Donado-Godoy et al. (2012), com o objetivo de determinar a prevalência da *Salmonella* em cortes de 1.003 carcaças de frango, apresentou *Salmonella* spp. em 27 % das carcaças analisadas.

2.1.4.1 Mecanismos governamentais de controle da *Salmonella* spp. em carcaças de frango de corte

Na Suécia, regulamentos governamentais impostos desde 1961, estipulam um controle da entrada de aves importadas para que se evite a contaminação por *Salmonella* spp. Além de um certificado de origem que garanta que elas não possuem tal bactéria, após o ingresso, estes animais são submetidos a uma quarentena por 15 semanas, período no qual são submetidos a quatro exames bacteriológicos. Caso o micro-organismo seja isolado, as aves são sacrificadas (Ribeiro, 2004).

Em 1995, considerando a importância da *Salmonella* Enteritidis como o sorovar mais encontrado em carne de aves, o MAPA implementou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que estabeleceu normas para inspeção de aves industriais em se tratando de *Salmonella*. Este programa prevê a avaliação microbiológica de todos os lotes de aves importadas e, posteriormente, de aves reprodutoras, de corte e postura, devendo ser feita logo nos primeiros dias de vida. Entretanto, sua operacionalização tem ficado muito aquém do desejado, pois esse micro-organismo predominou entre todos os sorovares isolados entre 1994 e 1999, correspondendo a 75,6% dos 45 sorovares isolados de aves no período (Brasil, 1995; Zancan et al., 2000; Andreatti Filho, 2001).

A RDC n° 12/2001 estabeleceu que *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g de carnes resfriadas ou congeladas, *in natura*, de bovinos, suínos e outros mamíferos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes), carnes moídas; miúdos de bovinos, suínos e outros mamíferos, ovos e derivados, mas não prevê a pesquisa deste micro-organismo em carcaças de frango (Brasil, 2001). Porém a ANVISA, através da RDC n° 39/2002 (Brasil, 2002), aprovou o

Regulamento técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carnes de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados com instruções mínimas obrigatórias que auxiliem o consumidor no controle do risco associado ao consumo destes alimentos nos quais a *Salmonella* spp. pode estar presente.

A Instrução Normativa nº 70 do MAPA (Brasil, 2003b) foi elaborada com a finalidade de conferir um controle minucioso sobre o processo de abate de frangos, através do monitoramento microbiológico, a fim de construir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção ao agente, o que permite a melhor eficiência das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (ARM). Esta IN visa efetuar a verificação da prevalência da *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, a formação de um banco de dados para análise dos índices de contaminação nos produtos, do estabelecimento de padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação e do monitoramento constante do nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves. Este banco de dados pode gerar um aumento das garantias de inocuidade dos produtos no mercado interno e externo além de atender às exigências de segurança do alimento baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

2.1.5 *Listeria monocytogenes* em carcaças de frango de corte

Em geral, *Listeria* spp. tem sido encontrada em leite cru, queijo fresco, carne e produtos cárneos frescos e congelados, carne de

frango, frutas, vegetais e produtos marinhos. Os grandes reservatórios deste agente de infecção são o solo, a silagem, o trato gastrointestinal de animais assintomáticos, principalmente mamíferos domésticos e silvestres, aves, peixes, crustáceos e ainda, fetos abortados e, ocasionalmente, nas descargas nasais e urina de animais doentes. Alguns estudos mostram que 1 a 10% da população humana é portadora de *Listeria monocytogenes* no trato intestinal (FDA, 1992; OIE, 2005; Barocci et al., 2007).

A contaminação das carcaças de aves pode ocorrer através do contato com as superfícies (equipamento), a água da escaldagem e aerossóis. Embora a fonte desta contaminação ainda não esteja totalmente esclarecida, parece que ocorre essencialmente nas últimas fases do processamento das carcaças. A contaminação das carcaças por *L. monocytogenes* pode acontecer durante ou depois da escalda e no pré-resfriamento (*chiller* e *pré-chiller*) por contaminação cruzada. Depois de uma carcaça ser contaminada em um abatedouro, vai contaminar os instrumentos e toda a linha de abate, o que posteriormente levará à contaminação de um elevado número de carcaças abatidas em seguida (Cox et al., 1997; Göksoy e Kikan., 2004; Barbalho et al., 2005; Veloso, 2007).

Nos abatedouros de aves, esta bactéria já foi isolada das superfícies de aço inoxidável, material de transporte, puxadores das portas, utensílios de limpeza, luvas dos manipuladores e água de lavagem. Geralmente, quanto maior a manipulação das carcaças, maiores são os índices de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* (Lawrence e Gilmour, 1994).

Ao analisar 40 amostras de cortes de peito de frango congelados, provenientes de supermercados, Gonçalves et al. (1998),

observaram 100% destas amostras com resultados positivos para *Listeria* spp., sendo que 50% eram de *L. monocytogenes*. Ao todo, foram isoladas 246 *Listeria* spp.: 52 identificadas como *L. monocytogenes*, três como *L. ivanovii*, 24 como *L. seeligeri*, 35 como *L. innocua* e 132 como *L. welshimeri*. Das *L. monocytogenes* isoladas, 51,9% pertenciam ao sorotipo ½ b, 30,8% ao 4 b e 17,3% ao ½ c.

De 63 amostras de carcaças de frango analisadas em Portugal por Antunes et al. (2002), todas se apresentavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo que 26 amostras (41%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

No trabalho desenvolvido por Mena et al. (2004), vários tipos de produtos alimentícios foram analisados quanto à presença de *L. monocytogenes* em Portugal. Das 1.035 amostras (leite, carne, peixes crus e alimentos termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Das 17 amostras de carne bovina crua, três (17,7%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Nove das 17 amostras de carne de frango crua (60%) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Vitas et al. (2004) investigaram a presença de *Listeria* spp. em 3.685 amostras de alimentos obtidas no Norte da Espanha. As amostras analisadas incluíam produtos crus (carne, leite e frango) e produtos processados (carne curada e cozida, vegetais congelados e salmão defumado). A maior ocorrência de *Listeria* spp. foi encontrada em amostras de carne de frango crua (76,3%) seguidas por amostras de carne moída vermelha bovina e suína (62,3%).

No Reino-Unido, foram referenciados dois casos de listeriose associados a frangos e perus adquiridos em supermercado, envolvendo uma mulher grávida e um

indivíduo com cancro, passando a carne de aves a ser considerada uma fonte de listeriose (Barbalho et al., 2005).

Chiarini (2007) avaliou a incidência de *L. monocytogenes* em dois abatedouros de frango do Estado de São Paulo. Em um abatedouro que possuía sistema de evisceração automática, foram colhidas 423 amostras e em outro, com evisceração manual, foram colhidas 428 amostras, em diferentes pontos da linha de produção. Foram feitas as análises de triagem, testes fenotípicos, identificação e tipagem das linhagens. Os abatedouros com evisceração automática e com evisceração manual apresentaram 20,1% e 16,4% das amostras positivas para *L. monocytogenes*, respectivamente. Todas as amostras positivas eram provenientes da área limpa dos abatedouros.

Dias (2008) também avaliou a incidência de *L. monocytogenes* em diferentes etapas de produção de carcaças de frango em um matadouro frigorífico situado no Estado de São Paulo e comparou os perfis genéticos de linhagens de *L. monocytogenes* obtidos no Brasil com outros obtidos de um matadouro de aves com a capacidade similar na Espanha. Verificou que, das 178 amostras coletadas, 28 delas (15,7%) eram positivas para este micro-organismo. A análise de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) forneceu nove pulsotipos, caracterizando quatro grupos clonais distintos. Desta forma, as diferentes linhagens encontradas nos dois países mostraram não haver correlação genética entre as linhagens do Brasil e da Espanha e que o comércio entre os países não proporcionava a disseminação da listeriose no país importador.

De acordo com Goulet et al. (2008), os casos de listeriose na França têm aumentado de maneira preocupante. De 1999 a 2005, a

incidência de casos declinou de 4,5 para 3,5 milhões de pessoas acometidas por ano. Em 2006, subiu para 4,7 milhões de casos por ano, em crescimento. Porém, os estudos epidemiológicos não sustentam que o consumo de alimentos seja o principal causador deste crescimento, mas os pesquisadores também não conseguem descartar esta possibilidade.

Cook et al. (2012), avaliando a prevalência de patógenos como *L. monocytogenes* em 318 cortes de peito de frango com pele e sem pele comercializados em mercearias de Waterloo, Canadá, no período de janeiro a dezembro de 2007, observaram que nos cortes de peitos sem pele este micro-organismo tinha uma menor prevalência (15%), e nos outros, sua prevalência era de 34%. Os autores sugeriram que a pele é um microbioma favorável para o desenvolvimento e manutenção de *L. monocytogenes*, demonstrando o risco de contaminação cruzada através do contato direto com fômites, bancadas e equipamentos.

Goh et al. (2012) realizaram um estudo de determinação da prevalência de *L. monocytogenes* em cortes de frango comercializados em hipermercados e feiras na Malásia e verificaram que o micro-organismo estava presente em 20% das amostras analisadas, sendo que o peito teve o maior índice (42,03%), seguido de sobrecoxa (11,27%) e de coxa (7,4%). Nos hipermercados, a incidência foi maior (25,71%), comparada à das feiras, que foi de 14,29%. Desta forma, os autores chamaram a atenção quanto a importância da exigência da pesquisa de *L. monocytogenes* na rotina de fiscalização para os produtos cárneos de origem avícola.

2.1.6 *Campylobacter* em carcaças de frangos de corte

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são encontrados no trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais domésticos e silvestres (bovinos, suínos, gatos, cães, roedores e, principalmente, de aves). Os pombos, gaivotas, pardais, patos, perus e especialmente, o frango, são considerados reservatórios primários de *C. jejuni*. Sabe-se que, nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo a bactéria ser encontrada em níveis de 10^9 UFC/g de fezes. A alta incidência de *C. jejuni* em frangos (frequência de 30 a 100%) pode se dar em resposta à sua temperatura ótima de multiplicação, uma vez que o trato intestinal das aves mantém uma temperatura superior à dos mamíferos, ou seja, cerca de 42°C (Blaser e Reller, 1981; Dickins et al., 2002; Forsythe, 2002; Park, 2002; Keener, 2004).

Todos os alimentos oriundos de animais contaminados por *Campylobacter* são considerados veículos potenciais de transmissão do micro-organismo. Partindo dessa premissa, os cuidados higiênicos e tecnológicos durante a evisceração de animais de abate são muito importantes. A incidência desse micro-organismo na carne pode variar de acordo com as condições de manejo durante a criação dos animais, com os cuidados higiênicos nas operações de abate e, com a posterior manipulação das carnes. No Brasil, são poucos os relatos sobre a veiculação das espécies de *Campylobacter* através de produtos de origem animal e sobre o envolvimento delas nas enfermidades transmitidas por alimentos (Bourgeois et al., 1994; Strohl et al., 2004). A escassez deste diagnóstico possivelmente pode ser devida às condições de isolamento do agente que, por se tratar de bactéria microaerófila, necessita de metodologia especial. As porcentagens de lotes de frango colonizados com *Campylobacter* variam muito entre os países e esta variação pode ser devido às diferentes técnicas de

amostragem e isolamento (Mead et al., 1999; Jorgensen et al., 2002; Newell, 2004).

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de diminuir a presença de *Campylobacter* na carne de frango. Porém, o resultado obtido tem sido limitado, pois são poucas as informações conclusivas de como esse micro-organismo contamina os lotes comerciais desse alimento. Além disso, ainda não existem programas de controle e monitoramento deste patógeno em granjas e nem legislação que exijam a pesquisa do mesmo na rotina de inspeção (Keener, 2004).

Em um trabalho realizado no Peru por Tresierra-Ayala et al. (1995), foi possível observar que 44,5% das 200 amostras foram positivas para *Campylobacter*, sendo que 21,5% das amostras eram de *C. jejuni*, 14% eram de *C. coli* e 9% de *C. lari*. Já no Chile, 25,7% das 300 amostras analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que 76,6% eram *C. jejuni* e 23,4% *C. coli*.

Lee et al. (1998) comprovaram que *C. jejuni* sobrevive por longos períodos (56 dias) armazenado em temperaturas inferiores a -20°C (temperatura da maioria dos freezers domésticos), apesar da redução de aproximadamente 5,0 Log₁₀ nas contagens de UFC/g por plaqueamento direto. Este fato mostrou que, durante este período, o micro-organismo pode manter-se viável e ser um risco para a saúde pública, por ser capaz de causar infecção.

Carvalho et al. (2002) pesquisaram *C. jejuni* nas diferentes etapas da linha de abate de um abatedouro avícola localizado na região nordeste do Estado de São Paulo. A água de lavagem das carcaças após a evisceração mostrou uma elevada taxa de contaminação por *Campylobacter*, sendo 61,3% das amostras positivas para este micro-organismo.

Dominguez et al. (2002), na Espanha, analisaram 198 amostras de carne de frango obtidas no varejo e encontraram 49,5% positivas para *Campylobacter* spp. Trabalho semelhante foi executado por Jorgensen et al. (2002), que isolaram, na Inglaterra, 83% de *Campylobacter* das 241 amostras de carnes de frango do varejo, demonstrando a importância das aves como reservatórios do micro-organismo.

Na Itália, Pezzotti et al. (2003) encontraram esse micro-organismo em 81,3% das 155 amostras de carne de frango do varejo e Sallam (2007), no Japão, observou que 110 (64,7%) de 170 amostras de frango estavam contaminadas por *Campylobacter*. Estes autores confirmaram os altos índices de contaminação por *Campylobacter* termofílico.

Keener (2004) demonstrou que, nos Estados Unidos, 60 a 80% das carcaças de frango estão contaminadas por *Campylobacter*, com contagens variando de 10.000 a 100.000 micro-organismos por carcaça.

Alter et al. (2005) avaliaram 43 amostras de peru e verificaram uma redução significativa na taxa de positividade (de 67,4 para 25,6%) das amostras após o resfriamento entre 0 e 3°C, por 24 h. As amostras foram enriquecidas em caldo Bolton, isoladas em ágar mCCDA e identificadas através de análise de PCR.

Georgsson et al. (2006), avaliaram a contaminação de carcaças de frangos por *Campylobacter* no momento da coleta e após 31 dias de estocagem a -20°C utilizando a técnica de plaqueamento direto. Estes autores verificaram uma redução nas contagens de *Campylobacter* de 0,65 a 2,87 Log₁₀ UFC/g após os 31 dias de estocagem. No entanto, apesar da redução significativa nas contagens, o índice de contaminação

após este período permaneceu na faixa de 3,13 a 4,01 Log₁₀ UFC/g.

Son et al. (2007) avaliaram carcaças na etapa do pré-chiller em abatedouros e encontraram o micro-organismo em 100% das carcaças analisadas. Da mesma forma, foram encontrados por Kuana et al. (2008), em Porto Alegre (RS), valores superiores a 97,9% de amostras positivas para *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte antes da imersão no chiller. Ao estudar carcaças após a passagem pelo chiller, Franchin et al. (2007), observaram 84,7% de amostras positivas para *Campylobacter* dentre as 335 amostras analisadas. A elevada contaminação das carcaças de aves nas etapas de pré-escaldagem e pré-chiller, pode ser explicada pela probabilidade de ruptura do intestino em fases anteriores, resultando em contaminação destas (Son et al., 2007).

Parisi et al. (2007), no sul da Itália, avaliaram 30 amostras de carne de frango do varejo e detectaram *Campylobacter* em 22 (76%) amostras. Em outro trabalho realizado também na Itália por Pepe et al. (2009), foi demonstrada a presença de *Campylobacter* em 37,1% das amostras de carcaças de frango. De acordo com Bardon et al. (2009), na República Tcheca, a ocorrência de *Campylobacter* em amostras de frango aumentou nos últimos anos. Em 2006, a frequência de *Campylobacter* era de 43%, aumentando para 46% em 2007 e 50% em 2008.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas das carcaças de frangos de corte foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), no período de junho de 2010 a maio de 2011.

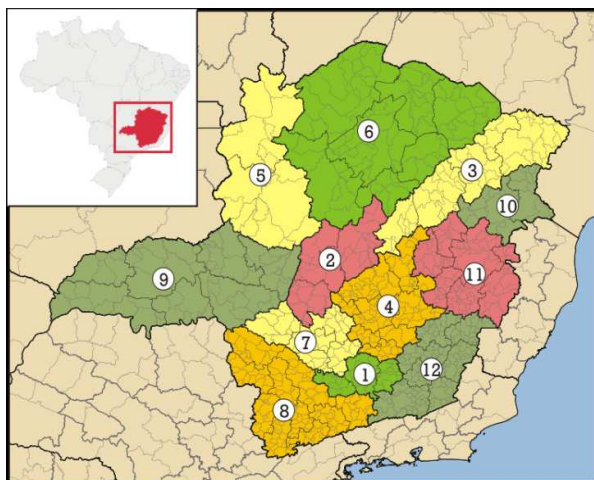
3.1. Amostras

As amostras de frangos de corte (resfriadas e congeladas, prontas para comercialização) foram coletadas, diretamente das indústrias (abatedouros avícolas), pelas coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do MAPA, localizadas no Estado de Minas Gerais. As amostras de carcaças de frangos foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e enviadas ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do IMA, localizado na Central de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA Minas), onde foram realizadas as análises microbiológicas.

3.1.1. Estratificação geográfica do Estado de Minas Gerais

Para maior representatividade da amostragem do projeto, o Estado de Minas Gerais foi dividido em doze mesorregiões, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conforme ilustrado na Fig. 1.

Determinadas as mesorregiões, foram verificadas em quais delas existiam estabelecimentos fiscalizados pelo SIF e pelo SIE, através do levantamento de dados efetuados pelo MAPA e pelo IMA. Uma vez conhecidos os estabelecimentos e suas localizações, estes foram numerados e sorteados aleatoriamente, por mesorregião e por sistema de inspeção. De acordo com a disponibilidade das indústrias por mesorregião em Minas Gerais, foram então selecionados dez estabelecimentos pelo SIF e pelo SIE para coleta de carcaças de frango, conforme descrito nas Tab. 1.



	Mesorregião	Microrregião	Municípios
1	Campo das Vertentes	3	36
2	Central Mineira	3	30
3	Jequitinhonha	6	53
4	Metropolitana de Belo Horizonte	8	105
5	Noroeste de Minas	2	19
6	Norte de Minas	7	89
7	Oeste de Minas	5	44
8	Sul e Sudoeste de Minas	10	146
9	Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	7	20
10	Vale do Mucuri	2	23
11	Vale do Rio Doce	7	99
12	Zona da Mata Mineira	7	142

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Anexo:Lista_de_mesorregi%C3%B5es_de_Minas_Gerais. Acessado em 14 de abril de 2009.

Figura 1. Divisão de Minas Gerais em mesorregiões e suas respectivas microrregiões e municípios correlatos.

Para cada estabelecimento produtor de carne de frango foram realizadas quatro coletas durante o período de junho de 2010 a maio de 2011, totalizando as quatro estações do ano.

Tabela 1. Municípios dos estabelecimentos sorteados por mesorregião de Minas Gerais e por sistema de fiscalização para frango

Mesorregião	Sistema de Inspeção	
	Federal	Estadual
Campo das Vertentes	Barbacena	-
Metropolitana	Pará de Minas	Belo Horizonte
Oeste de Minas	São Sebastião do Oeste	Bambuí/Oliveira
Sul e Sudoeste	Passos	Passos
Triângulo Mineiro	Uberaba	Uberlândia

De cada estabelecimento e de cada coleta foram encaminhadas para análise seis amostras de seis lotes iguais de produção (cada amostra foi considerada uma repetição), totalizando 240 amostras (seis repetições x quatro estações x 10 estabelecimentos). De acordo com a

característica de comercialização da indústria frigorífica, as carcaças de frango foram coletadas congeladas (138 carcaças provenientes de três indústrias sob inspeção federal e três indústrias sob inspeção estadual) ou resfriadas (102 carcaças provenientes de duas indústrias sob inspeção federal e duas indústrias sob inspeção estadual).

3.1.2 Temperatura e pluviosidade das mesorregiões avaliadas

Com o objetivo de avaliar as respostas microbiológicas encontradas, foram coletados dados referentes às médias de precipitação pluviométrica (mm) assim como temperatura máxima e mínima (°C) por estação do ano e por mesorregião. Os dados foram referentes ao período de maio de 2010 a junho de 2011, período em que ocorreram as coletas.

Os dados de precipitação pluviométrica das mesorregiões por estação durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Precipitação pluviométrica (mm) por estação do ano e por mesorregião durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações do ano (média de precipitação – 2010/2011)			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Sul e Sudoeste	23,13	193,97	184,43	114,83
Campo das Vertentes	16,37	163,43	247,13	129,77
Oeste de Minas	7,37	175,37	199,97	173,00
Metropolitana	4,87	228,07	225,90	146,07
Triângulo Mineiro	8,60	205,13	233,03	310,37
Média	12,07	193,19	218,09	174,81

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

É possível observar que o inverno apresentou menor precipitação pluviométrica e o verão foi a estação que teve maiores médias de precipitação.

Os dados de temperatura máxima e mínima das mesorregiões por estação do ano durante os anos de 2010 e 2011 são apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Temperaturas máxima e mínima por estação do ano e por mesorregião, durante os anos de 2010 e 2011

Mesorregião	Estações do ano (média °C – 2010/2011)							
	Inverno		Primavera		Verão		Outono	
	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
Sul e Sudoeste	25,07	14,70	25,17	14,27	28,03	17,50	25,07	14,70
Campo das Vertentes	25,20	11,80	27,43	15,90	29,87	19,00	26,97	16,4
Oeste de Minas	27,47	10,13	29,57	16,60	31,43	19,33	28,80	16,07
Metropolitana	25,50	15,20	27,60	17,63	29,47	20,03	26,90	18,43
Triângulo Mineiro	29,40	12,97	31,33	17,87	31,03	19,97	29,37	17,10

Fonte: Adaptado de Brasil, 2013.

3.2 Variáveis Analisadas

3.2.2 Avaliação microbiológica das carcaças dos frangos de corte

De cada carcaça foram retiradas, asséptica e aleatoriamente, 25 g compostas por porções de pele e músculo de diferentes partes (cloaca, pescoço, peito e coxa) e acondicionadas em sacos plásticos estéreis. Após a adição de diluentes específicos para cada análise, as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos em homogeneizador tipo Stomacher (Fig. 2).

Foram realizadas as seguintes análises:

- contagem de coliformes totais e termotolerantes (UFC/g) através do método

do Simplate™ (AOAC, 2005a), empregando as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} ;

- pesquisa de *E. coli* O157 (bioMérieux, 2010);

- contagem de *Staphylococcus* spp. no ágar Baird Parker (Brasil, 2003a), empregando as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . As amostras que apresentaram colônias no Ágar Baird Parker e que se mostraram negativas ao teste da coagulase foram submetidas à coloração de Gram e, posteriormente, a testes bioquímicos para determinar o gênero e espécie do micro-organismo isolado;

- pesquisa de *Salmonella* spp. (AOAC, 2005c);

- pesquisa de *Listeria monocytogenes* (AOAC, 2004);

- pesquisa de *Campylobacter* spp. (bioMérieux SA, 2007).

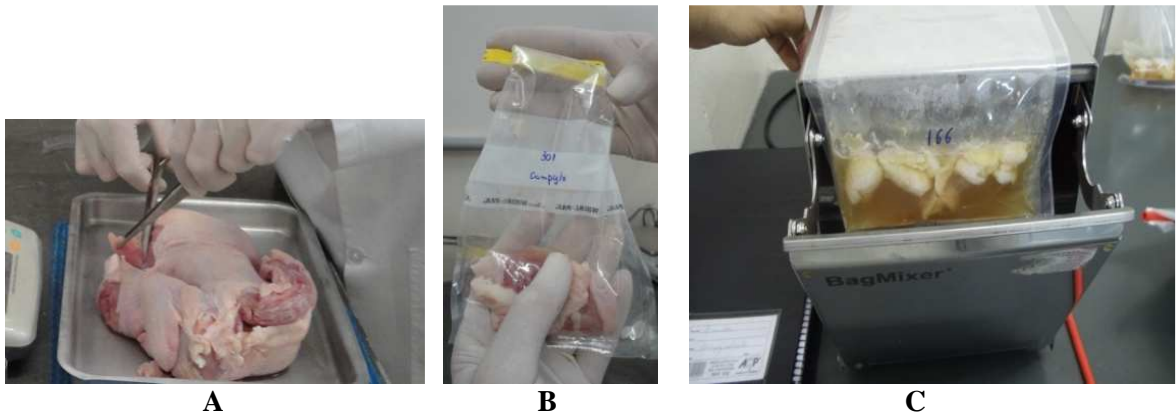


Figura 2. Pesagem (A e B) e homogeneização das amostras (C).

As amostras passaram por etapas de pré-incubação e incubação em temperaturas e em meios de cultura específicos. Para as análises imunoenzimáticas de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E.coli* O157 foi retirada uma alíquota de 1 mL do caldo de enriquecimento seletivo que foi aquecida a 100°C por 15 minutos. Estas alíquotas foram distribuídas em barretas específicas para

análise no sistema Vidas™30 (Fig. 3 e 4). Para a análise de *Listeria monocytogenes* não foi necessária a etapa de aquecimento a 100°C por 15 minutos, respeitando o protocolo empregado (AOAC, 2004). O restante do caldo que não foi aquecido foi conservado para confirmação por testes bioquímicos em caso de resultado positivo.

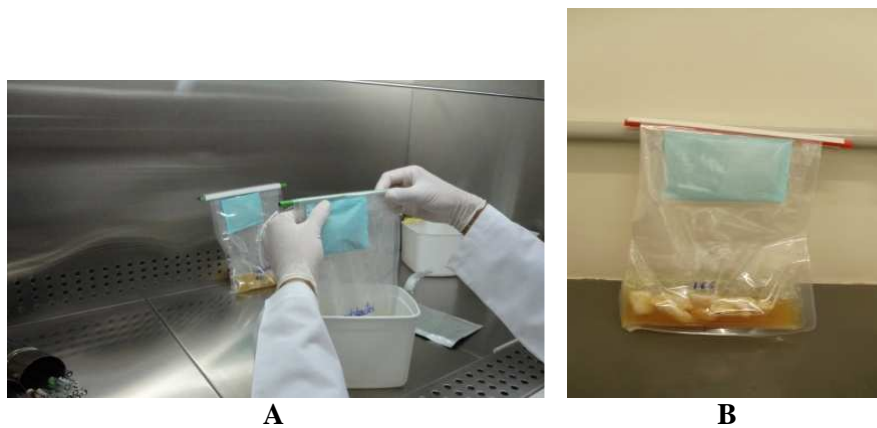


Figura 3. Colocação do gerador de microaerofilia (A) e barra de vedação (B) para análise de *Campylobacter* pelo método ELFA.



Figura 4. Distribuição das amostras nas barretas para realização das análises pelo método ELFA.

Para interpretação dos resultados pela técnica ELFA através do equipamento Vidas™30 (Fig. 5), foram considerados positivos ou negativos os resultados conforme descrito no Quadro 1.



Figura 5. Equipamento Vidas™30, com cones e barretas.

O sistema Vidas™30 efetua duas leituras de fluorescência pelo sistema óptico para cada análise. A primeira leitura corresponde ao branco antes do contato do substrato com o cone. A segunda leitura é efetuada após a incubação do substrato com o anticorpo presente no cone. O Valor de Fluorescência Relativo (RFV - relative fluorescence value) é o resultado da diferença das duas medidas. O RFV obtido de cada amostra é

interpretado pelo sistema Vidas™30 da seguinte forma:

$$\text{Valor do Teste} = \frac{\text{RFV}_{\text{amostras}}}{\text{RFV}_{\text{calibrador}}}$$

Um resultado com um valor de teste inferior ao valor limiar indica uma amostra que não contém antígenos ou que contém uma concentração de antígenos inferior ao limite da detecção do método, que corresponderá a um resultado negativo.

Quadro 1. Limiar e interpretação dos resultados de fluorescência para o teste Vidas™30 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* O157

Parâmetro	Valor do teste	
	Positivo	Negativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	≥0,05	<0,05
<i>Salmonella</i> spp.	≥0,23	<0,23
<i>Campylobacter</i> spp.	≥0,10	<0,10
<i>E.coli</i> O157	≥0,10	<0,10

No caso de *E. coli*, o teste ELFA automatizado permite a detecção das linhagens móveis e imóveis de *E. coli* O157. No entanto, podem ser observadas reações cruzadas com linhagens que possuem antígeno O157 que não as *E. coli*, tais como algumas bactérias do gênero *Salmonella* do

grupo N e alguns *Citrobacter*, gerando resultados discordantes entre os positivos no teste Vidas™30, sendo necessária a utilização de métodos moleculares como o da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para confirmação e conclusão do diagnóstico definitivo (bioMeriéux, 2010). Desta forma, para as amostras positivas para *E. coli* O157 pelo método ELFA, foram realizadas as pesquisas de *E. coli* O157:H7 pelo método PCR *Real Time* (AOAC, 2005b).

3.2.3 Testes bioquímicos confirmatórios de positividade das amostras nos ensaios de *Staphylococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* O157 nas carcaças de frango de corte

Com o objetivo de confirmar a presença dos micro-organismos identificados e determinar o gênero e espécie (quando possível) dos micro-organismos encontrados, foram feitos testes bioquímicos de colônias isoladas utilizando-se, para isto, o equipamento Vitek™2 (bioMeriéux, 2008).

Colônias negativas no teste de coagulase presuntivo para *Staphylococcus* spp., assim como amostras positivas nos testes imunoenzimáticos para *Salmonella* spp., *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter*, foram repicadas em meios seletivos e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas em condições ideais de temperatura. Em seguida, as colônias isoladas nesses meios foram novamente repicadas em ágar sangue de carneiro (a fim de confirmar pureza da amostra e facilitar a coleta de colônias homogêneas) sendo, então, incubadas invertidas por 24 horas em estufa bacteriológica em temperatura e condições ótimas de crescimento para cada micro-organismo.

Para conferir as características morfo-tintoriais das colônias, foram feitos esfregaços e coloração de Gram de todas as amostras que foram submetidas à análise bioquímica. Para cada tipo de características morfo-tintoriais, foram utilizados diferentes tipos de cartões empregados nos testes bioquímicos do Vitek™2 (Anexo I). Para identificação de colônias de Gram positivo foram utilizados cartões GP (Gram *positive*), para colônias de Gram negativo foram utilizados cartões GN (Gram *negative*) e para colônias suspeitas de *Campylobacter* spp. cujas características morfo-tintoriais do micro-organismo eram de bacilos Gram negativo, em formato de vírgula ou saca-rolha, foram utilizados o cartão NH (*Neisseria and Haemophilus*). A seleção criteriosa das colônias e a identificação morfo-tintorial para o correto direcionamento para o emprego do sistema Vitek™2 foram consideradas as etapas de maior exigência técnica do analista, visto que a inobservância poderia levar a interpretações indevidas, gerando resultados conflitantes como, por exemplo, interpretações de *Kocuria* spp. no lugar de *Staphylococcus epidermidis* (Bem-Ami et al., 2005).

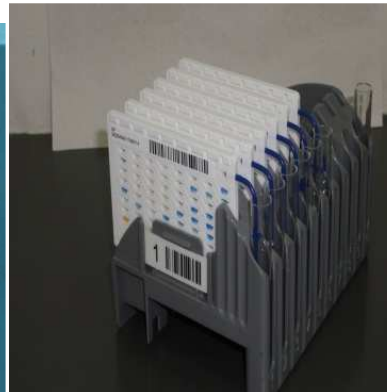
Posteriormente, colônias bem isoladas no ágar sangue foram transferidas, com o auxílio de uma alça descartável de 0,1 µL, para um tubo de poliestireno transparente com 3 mL de solução fisiológica (0,45%) estéril, formando uma suspensão bacteriana, que foi ajustada até atingir turbidez correspondente aos valores entre 0,5 a 0,63 para *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* e entre 2,7 a 3,30 para *Campylobacter* spp. Para o ajuste da turbidez, fez-se necessário o emprego do equipamento DensiCheck 2 (bioMeriéux, Hazelwood, Missouri, USA) (Fig. 6).



Eleição da colônia pura para inoculação em solução salina estéril



Verificação da concentração bacteriana através do densímetro DensiCheck

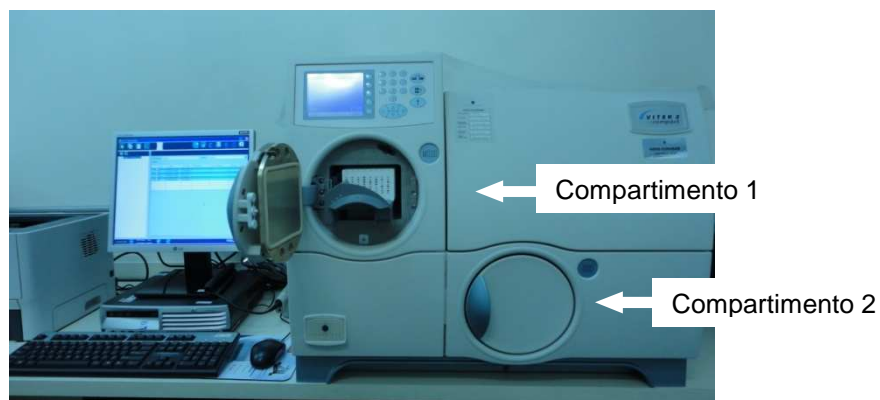


Montagem da estante com o tubo contendo a suspensão bacteriana e o cartão de interesse.

Figura 6. Etapas do procedimento para realização das provas bioquímicas no Vitek™2.

Após este procedimento, uma estante específica para o equipamento Vitek™2 foi montada com os tubos de poliestireno contendo a suspensão bacteriana e os caldos de interesse (GP, GN ou NH) e em seguida, esta estante foi colocada no primeiro compartimento do aparelho, onde foi

submetida a vácuo, para promover o preenchimento automático do cartão com a suspensão bacteriana. Depois desta etapa, a estante foi transferida para o segundo compartimento para os cartões serem selados e incubados (Fig.7).



Colocação da estante no primeiro compartimento, onde os cartões foram preenchidos por vácuo para, posteriormente, serem transferidos para o segundo compartimento a fim de serem selados e incubados.

Figura 7. Aparelho de identificação bioquímica Vitek™2.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a avaliação das mesorregiões em relação às estações do ano, as análises microbiológicas das carcaças de frango foram conduzidas como um delineamento inteiramente ao acaso (DIC) em arranjo fatorial 10 x 4 (10 estabelecimentos x quatro estações) sendo seis repetições por tratamento totalizando 240 amostras. Em relação à temperatura de comercialização, foi utilizado o DIC em arranjo fatorial 10 x 2 (10 estabelecimentos x duas temperaturas de comercialização – congelada ou resfriada) sendo 12 repetições por tratamento. Cada carcaça de frango foi considerada uma repetição.

Para a avaliação das variáveis microbiológicas, foi realizada a transformação de dados e aquelas que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%, segundo Sampaio (2002). Para avaliação entre as estações do ano e a temperatura de comercialização, foi empregado o teste de Qui-quadrado. Algumas variáveis microbiológicas também foram discutidas através de análises estatísticas descritivas, devido à ausência ou baixo número de amostras positivas observadas no experimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como as carcaças de frangos de corte são produzidas e comercializadas refrigeradas ou congeladas, este produto não sofre influência do tipo de clima da mesorregião em que foi produzido, ou seja, a temperatura e a umidade da mesorregião de produção das carcaças não influenciam na carga microbiana dessas, pois são vendidas climatizadas.

5.1 Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C em carcaças de frango de corte

Os resultados das análises de contagem de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C são apresentados na Tab. 4. Para estes parâmetros, não foram observadas diferenças entre os resultados encontrados ($P > 0,05$). Das 240 amostras analisadas, 158 amostras (65,8%) não apresentaram estes micro-organismos. Dentre as 82 amostras positivas, 37,8% apresentaram-se com limites de coliformes a 35°C entre $1,0 \times 10^4$ UFC/g e $2,5 \times 10^8$ UFC/g. Para coliformes a 45°C, 13% das amostras apresentaram valores entre $1,0 \times 10^4$ UFC/g e $5,1 \times 10^7$ UFC/g. Estes índices se apresentaram uniformes em todas as estações do ano.

Tabela 4. Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 35°C e a 45°C em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)								Média	
	Primavera		Verão		Outono		Inverno			
	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C	35°C	45°C
Sul e Sudoeste	$1,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$7,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^7$	$9,7 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Campo das Vertentes	$7,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$8,7 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
Oeste de Minas	$6,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$5,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$
Metropolitana	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$8,4 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^3$	$7,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$
Triângulo Mineiro	$8,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$3,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	$3,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^3$
Média	$4,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$		

As diversas temperaturas e umidades encontradas nas mesorregiões estudadas não influenciaram o desenvolvimento de coliformes nas carcaças de frangos de corte ($P > 0,05$), e a presença dos mesmos, pode ser devido a problemas no manejo das carcaças, limpezas ineficientes, condições sanitárias insatisfatórias ou problemas durante a estocagem.

Apesar da legislação vigente considerar uma tolerância máxima de 10^4 UFC/g apenas para coliformes termotolerantes em carcaças de frango, foi observado que 31 amostras das 240 analisadas (37,8%) apresentaram contagens maiores que $1,0 \times 10^4$ UFC/g para coliformes a 35°C , e 11 amostras (13%) apresentaram contagens até $5,1 \times 10^7$ UFC/g para coliformes a 45°C . Para os coliformes a 45°C , a mesorregião Sul e Sudoeste se apresentou com médias acima de 10^4 UFC/g nas estações de verão, outono e inverno. A mesorregião Oeste de Minas mostrou-se fora do padrão exigido pela legislação vigente, no verão e no outono.

Estes índices são preocupantes, considerando que estes micro-organismos são indicadores sanitários e que, uma vez presentes, pode-se inferir que outros patógenos de veiculação fecal podem estar presentes (Jay, 2005).

Segundo afirmaram Paton e Paton (1998), a detecção de coliformes nem sempre está associada à detecção de *E. coli* enterohemorrágica, devido às diferenças técnicas da pesquisa (temperaturas de incubação e

exigências nutricionais diferentes, por exemplo). Mas altos índices de coliformes, como os encontrados neste trabalho sugerem um alerta quanto à possibilidade de se encontrar outros micro-organismos que podem causar um amplo espectro de doenças, dentre elas as diarreias, as infecções do trato urinário e as meningites.

Os índices de contaminação por micro-organismos coliformes totais e termotolerantes encontrados no presente trabalho foram inferiores aos encontrados por Leite e Franco (2006), que descreveram um nível de 40% das amostras contaminadas por coliformes termotolerantes em 30 amostras de frango obtidas de estabelecimentos com ou sem inspeção, que comercializam carnes no Rio de Janeiro. Ao contrário, Pires et al. (2009) não encontraram valores de coliformes superiores aos preconizados pela legislação ao pesquisarem estes micro-organismos em carcaças de frangos comercializadas em Recife.

Na Tab. 5 são apresentados os resultados das análises de contaminação por coliformes a 35°C , de acordo com a temperatura de comercialização das carcaças (congeladas ou resfriadas). Para este parâmetro, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados encontrados ($P > 0,05$). Portanto, as estações do ano e as temperaturas de comercialização das carcaças não influenciaram na contaminação destas por coliformes, a 35°C .

Tabela 5. Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 35°C por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura	Estações do ano (UFC/g)				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Congelada	$4,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
Resfriada	$6,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$
Média	$5,4 \times 10^5$	$5,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	

Na Tab. 6 são apresentados os resultados das análises de coliformes a 45°C de acordo com

a temperatura de comercialização das carcaças (congeladas ou resfriadas).

Tabela 6. Contagens médias (UFC/g) de coliformes a 45°C por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas e comercializadas no Estado de Minas Gerais, por estação do ano

Temperatura	Estações do ano (UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Congelada	1,0 x 10 ² c	1,2 x 10 ⁴ c	1,1 x 10 ⁴ c	6,5 x 10 ² c
Resfriada	1,0 x 10 ² c	1,5 x 10² bc	4,0 x 10³ a	2,0 x 10² b

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

Para as carcaças congeladas, não houve diferença estatística (P>0,05) entre as estações do ano. Já as carcaças resfriadas apresentaram diferentes valores de coliformes a 45°C entre as estações do ano e o nível de contaminação por estes micro-organismos foi semelhante e mais baixo durante a primavera e o verão (P<0,05). Durante a estação do inverno, o nível de contaminação foi superior ao encontrado na primavera, porém, semelhante ao encontrado no verão, além de ser inferior ao nível de

contaminação por coliformes a 45°C encontrado no outono (P<0,05), que apresentou as maiores médias.

5.2 Pesquisa de *E. coli* O157 em carcaças de frango de corte

Das 240 amostras analisadas, nove delas (3,75%) apresentaram-se positivas para *E. coli* O157 utilizando o método ELFA (bioMerioux, 2010) (Tab. 7)

Tabela 7. Número de amostras positivas para *E. coli* O157 em carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (número de amostras positivas)				Total
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	1	0	2	5	8
Campo das Vertentes	0	0	0	0	0
Oeste de Minas	0	0	0	0	0
Metropolitana	0	0	0	0	0
Triângulo Mineiro	0	1	0	0	1
Total	1	1	2	5	9

Em relação às mesorregiões analisadas, apenas as mesorregiões do Sul e Sudoeste e Triângulo Mineiro apresentaram amostras positivas para *E. coli* O157. Oito das nove amostras positivas para *E. coli* O157 (88,9% das positivas) foram provenientes da mesorregião Sul e Sudoeste sendo que cinco destas carcaças contaminadas foram encontradas durante a estação do inverno.

Em todas as estações do ano foram observadas amostras positivas para *E. coli* O157. Diante disso, é possível afirmar que a temperatura e a umidade do ambiente não influenciaram no desenvolvimento destes micro-organismos na carcaça de frango.

Quanto à temperatura de comercialização das carcaças (Tab. 8), foi observado que, das

nove carcaças contaminadas, apenas uma fora comercializada congelada. Das oito carcaças resfriadas positivas para *E. coli* O157, uma foi encontrada durante o verão, duas no outono e cinco no inverno. Porém,

não foi observada associação entre os grupos experimentais pelo teste de Qui-quadrado quanto à temperatura de comercialização das carcaças.

Tabela 8. Número de amostras positivas e negativas para *E. coli* O157 por estação do ano e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas e comercializadas no Estado de Minas Gerais

Temperatura da carcaça	Estação do ano				Pesquisa de <i>E. coli</i> O157	
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Presença	Ausência
Congelada	1	0	0	0	1 (0,9%)	107 (99,1%)
Resfriada	0	1	2	5	8 (6,1%)	124 (93,9%)
Total	1	1	2	5	9	

Segundo Beery et al. (1985), assim como outros membros da família das *Enterobacteriaceae*, *E. coli* O157 pode colonizar o ceco de frangos e ser excretada por vários meses. Considerando este aspecto, Doyle e Schoeni (1987) afirmaram que *E. coli* O157 está associada com produtos de origem animal, e não especificamente com a carne bovina, uma vez que detectaram este micro-organismo em tipos diferentes de carnes, inclusive de frango, que apresentou 1,5% de positividade.

Da mesma forma que no presente trabalho, Tutenel et al. (2003) encontraram resultados positivos de *E. coli* O157 utilizando a técnica do sistema Vidas ECO™. Das 274 amostras (entre suaves e carcaças de frango), 35% foram positivas neste método. Porém, nenhuma foi confirmada por outros métodos, demonstrando-se a sua baixa especificidade.

O método de análise empregado para detecção de *E. coli* O157 (ELFA) neste trabalho permite a detecção de linhagens móveis e imóveis de *E. coli* O157, podendo gerar resultados falso positivos. Desta forma, é importante observar que podem acontecer reações cruzadas com linhagens que possuem antígeno O que não *E. coli*,

como é o caso de algumas salmonelas. Dessa maneira, segundo BioMerioux (2010), os resultados positivos devem ser confirmados por outras metodologias analíticas, para não se gerar resultados falso-positivos.

5.3 Pesquisa de *E. coli* O157:H7 em carcaças de frango de corte

Com a finalidade de confirmar as amostras positivas encontradas pelo método ELFA, foi utilizado o método molecular do PCR *Real Time* utilizando-se o equipamento GDS Assurance Gold (VWR International, Pennsylvania, USA). Das nove amostras positivas encontradas pela metodologia ELFA, nenhuma apresentou resultado positivo para *E. coli* O157:H7. Consequentemente, não foi realizada a pesquisa de linhagens produtoras de toxina tipo *Shiga*. Esses resultados corroboram os resultados de Lee et al. (2009) que, inicialmente, identificaram a presença de *E. coli* e, posteriormente, fizeram a caracterização dos micro-organismos isolados e, apesar de terem isolado linhagens de EHEC nas amostras testadas, incluindo amostras de carne de frango, de boi e de suíno, nenhuma delas era *E. coli* O157:H7.

Nos trabalhos em que *E.coli* O157:H7 foi isolada de carcaças de frango ou derivados de carne de frango, as amostras foram coletadas em supermercados e açougues, onde produtos cárneos de outras espécies também são comercializados, podendo haver contaminação cruzada das carnes de frangos e carnes de outras espécies animais naturalmente contaminadas ou por contato em superfícies contaminadas (biofilme) (Doyle e Schoeni, 1987; Abdul-Raouf et al., 1996; Akkaya et al., 2006; Chinen et al., 2009). Esta é uma diferença metodológica importante do presente trabalho, no qual as amostras de carcaça de frango foram coletadas nas câmaras frias dos abatedouros frigoríficos e encaminhadas diretamente para o laboratório onde foram analisadas.

De acordo Abdul-Raouf et al. (1996), a presença de *E. coli* O157:H7 nos alimentos à base de frango pode ser justificada pela ocorrência de contaminação cruzada durante o manuseio dos mesmos, não sendo descartada a possibilidade da contaminação da água por esse micro-organismo. Akkaya et al. (2006), também concluíram que a presença de *E. coli* O157:H7 em carne de frango sugere que o frango seja um reservatório desse micro-organismo ou que possa ter ocorrido a contaminação durante seu transporte ou através da água utilizada em várias etapas do abate de frangos. Chinen et al. (2009), ao pesquisarem *E. coli* O157:H7, encontraram linhagens idênticas desse micro-organismo em amostras de diferentes restaurantes, em produtos cozidos e não cozidos, em produtos de carne bovina e de carne de frango, e em períodos diferentes de amostragem. De acordo com estes autores, a presença de linhagens idênticas em diferentes restaurantes sugere a ocorrência de uma fonte comum de contaminação, provavelmente na planta de processamento ou durante o transporte. A presença de linhagens idênticas nos produtos crus e cozidos ocorreu, provavelmente,

devido ao mau cozimento do produto ou por contato do produto cozido com o produto cru ou com superfícies contaminadas. A provável justificativa para a presença de linhagens idênticas em amostras de frango e bovina seria a contaminação cruzada vinda da amostra bovina, o que pode ter ocorrido no restaurante ou em etapas anteriores do processamento.

Alonso et al. (2012) isolaram linhagens de STEC em 5% dos produtos de 1.057 amostras de frango testados e, destas amostras isoladas, nenhuma linhagem de *E.coli* O157:H7 foi encontrada. Embora tenha sido isolada linhagem de STEC dos produtos de frango, somente 0,1% dos suabes de cloaca foi positivo para STEC. Os autores concluíram que a contaminação por STEC nas amostras de frango provavelmente foi resultante de contaminação cruzada durante o manuseio, especialmente nos açougues.

Da mesma forma, Lima (2012) não detectou a presença de *E. coli* O157:H7 em 240 amostras de carcaças de frango comercializadas no Estado de Minas Gerais.

No presente trabalho, a ausência de contaminação das carcaças de frango por *E. coli* O157:H7 mostrou que não houve influência da temperatura de comercialização (congelado ou resfriado) e nem da estação do ano para o desenvolvimento deste micro-organismo.

Apesar da alta contaminação por coliformes termotolerantes, as carcaças de frango obtidas dos abatedouros das diversas regiões

do Estado de Minas Gerais não representam um risco para a saúde pública, com relação à presença de *E. coli* O157:H7, desde que processadas adequadamente e que não ocorram contaminações cruzadas durante as várias etapas do processo de produção.

5.4 Contagem de *Staphylococcus* spp. em carcaças de frango de corte

Os resultados das análises para contagem de *Staphylococcus* spp. são apresentados na

Tab. 9. Para esta variável, foi observada diferença entre as estações do ano e as diferentes mesorregiões estudadas ($P < 0,05$).

Tabela 9. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* spp. em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	$1,6 \times 10^4$ Bb	$1,9 \times 10^4$ ABb	$4,1 \times 10^4$ Bb	$1,0 \times 10^6$ Bb
Campo das Vertentes	$7,2 \times 10^4$ Bb	$1,5 \times 10^3$ Bb	$8,3 \times 10^2$ Bb	$6,4 \times 10^2$ Bb
Oeste de Minas	$5,7 \times 10^5$ Bab	$6,3 \times 10^5$ Aa	$1,6 \times 10^5$ Bab	$1,5 \times 10^4$ Bb
Metropolitana	$1,2 \times 10^4$ Bb	$6,2 \times 10^3$ ABb	$1,7 \times 10^4$ Bb	$3,5 \times 10^3$ Bb
Triângulo Mineiro	$1,7 \times 10^5$ Bb	$2,2 \times 10^3$ Bb	$3,2 \times 10^3$ Bb	$1,7 \times 10^3$ Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Todas as amostras de carcaças analisadas foram positivas para estes micro-organismos e 69% apresentaram valores acima de 10^3 UFC/g. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) de contaminação por este micro-organismo entre as mesorregiões do Estado de Minas Gerais dentro das estações primavera, outono e inverno. Porém, durante o verão as amostras coletadas na mesorregião do Oeste de Minas apresentaram maior nível de contaminação que as mesorregiões de Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro. A mesorregião do Oeste de Minas apresentou as maiores temperaturas neste período em relação das demais mesorregiões. As mesorregiões Sul e Sudoeste e Metropolitana foram semelhantes entre as demais mesorregiões na estação do verão. As mesorregiões Sul e Sudoeste, Campo das Vertentes, Metropolitana e Triângulo Mineiro apresentaram comportamento semelhante durante todas as estações do ano. Na mesorregião do Oeste de Minas foi observado um menor nível de contaminação por esta bactéria no inverno ($P < 0,05$).

Na estação da primavera, foram observados valores elevados de *Staphylococcus* spp. (acima de 10^5 UFC/g) na mesorregião do

Oeste de Minas, onde foram verificadas temperaturas médias de $16,6^\circ\text{C}$ a $29,3^\circ\text{C}$, sendo as mesmas inferiores apenas às médias encontradas no Triângulo Mineiro no mesmo período ($17,9^\circ\text{C}$ a $31,3^\circ\text{C}$). Desta forma, considerando os resultados encontrados e avaliando as estações do ano, observa-se que nem a umidade, nem a temperatura exerceu um papel importante na manutenção e viabilidade destes micro-organismos na carcaça dos frangos.

Os resultados da enumeração de *Staphylococcus* spp. encontrados neste trabalho foram superiores aos obtidos por Shimizu et al. (2005) e Koluman et al. (2011), que obtiveram 65,8% e 52% de amostras positivas, respectivamente. Estes altos índices de *Staphylococcus* spp. causam preocupação, uma vez que sua presença indica falhas no processo de produção e oferece chances de desenvolvimento destes micro-organismos durante a manipulação e preparo deste produto como alimento. Considerando o potencial enterotoxigênico de algumas linhagens de *Staphylococcus*, o risco aumenta ainda mais.

A legislação brasileira não prevê a pesquisa de *Staphylococcus* spp. em carcaças de

frango. Desta forma, a avaliação da qualidade do produto baseada neste parâmetro fica comprometida, uma vez que não há padrão determinado para tal produto (Brasil, 2001).

No Brasil, dos 800 surtos que envolveram *Staphylococcus* no ano de 2011, 200 deles estavam associados ao consumo de carne de frango, apesar de não ter sido possível

afirmar se a contaminação foi originada da matéria prima ou do processamento (Brasil, 2011).

Das 240 amostras pesquisadas e que foram positivas para *Staphylococcus* spp., 23,8% eram *Staphylococcus* coagulase positivo (Tab. 10), e as demais (76,2%) eram *Staphylococcus* coagulase negativo (Tab. 11).

Tabela 10. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase positivo em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (média UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	1,1 x 10 ² Aa	1,5 x 10 ² Aa	1,8 x 10² ABb	3,5 x 10 ² Aa
Campo das Vertentes	7,5 x 10 ¹ Aa	5,0 x 10 ¹ Aa	5,0 x 10 ¹ Aa	1,3 x 10 ² Aa
Oeste de Minas	2,1 x 10 ² Aa	3,5 x 10 ² Aa	2,6 x 10² ABa	3,8 x 10 ² Aa
Metropolitana	5,6 x 10 ² Aa	1,6 x 10 ³ Aa	1,8 x 10³ Ba	5,1 x 10 ² Aa
Triângulo Mineiro	1,4 x 10 ² Aa	1,5 x 10 ² Aa	1,8 x 10 ² Aa	6,0 x 10 ² Aa

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

Ao estudar cada mesorregião separadamente, não foram observadas diferenças (P>0,05) entre as estações do ano para contaminação das carcaças de frangos de corte por *Staphylococcus* coagulase positivo. Porém, durante o outono foi observada uma maior contaminação deste micro-organismo na mesorregião

Metropolitana. As mesorregiões Sul e Sudoeste e Oeste de Minas foram semelhantes em relação à mesorregião Metropolitana. No outono, as mesorregiões do Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes apresentaram os menores índices de contaminação sendo diferentes das demais mesorregiões (P<0,05).

Tabela 11. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase negativo em carcaças de frangos produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (média UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sul e Sudoeste	1,5 x 10 ³ Bb	1,9 x 10 ⁴ Bb	4,1 x 10⁴ ABb	1,0 x 10⁶ Ab
Campo das Vertentes	7,2 x 10 ³ Bb	1,5 x 10³ Ba	8,3 x 10² ABb	6,4 x 10² ABb
Oeste de Minas	5,6 x 10⁵ Bab	6,3 x 10⁵ Aa	1,6 x 10⁵ Aab	1,5 x 10⁴ ABb
Metropolitana	1,2 x 10 ⁴ Bb	5,0 x 10³ ABb	5,4 x 10³ ABb	3,1 x 10³ ABb
Triângulo Mineiro	1,7 x 10 ⁵ Bb	2,0 x 10 ³ Bb	3,0 x 10 ³ Bb	1,2 x 10 ³ Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Em relação à contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo, foi observado que, nas mesorregiões Sul e

Sudoeste, Metropolitana e Triângulo Mineiro, não houve diferença (P>0,05) em nenhuma estação do ano. Porém, na

mesorregião de Campo das Vertentes, durante o verão foi observada uma maior contaminação por esta bactéria. Da mesma forma, na mesorregião do Oeste de Minas, a maior concentração também foi no verão e a menor no inverno, sendo que nas demais estações, a contaminação foi semelhante ($P < 0,05$).

Ao avaliar as estações do ano, foram observadas condições diferentes para as diferentes mesorregiões estudadas. Durante a primavera, não foram observadas diferenças significativas entre as mesorregiões, porém, no verão, a mesorregião Oeste de Minas apresentou uma maior contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo e as mesorregiões Sul e Sudoeste, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro apresentaram as menores contaminações das carcaças. No outono, também foram observadas maiores níveis de contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo na mesorregião do Oeste de Minas e a mesorregião do Triângulo Mineiro apresentou as menores contaminações. No

inverno, as maiores contaminações das carcaças ($P < 0,05$) por estes microorganismos foram verificadas na mesorregião de Sul e Sudoeste e as menores na mesorregião do Triângulo Mineiro. Diante do exposto, é possível inferir que as diferenças quanto à temperatura e pluviosidade não interferiram no desenvolvimento dos *Staphylococcus* coagulase negativo, uma vez que contagens elevadas foram encontradas em todas as estações, inclusive no inverno, cujas temperaturas médias mínimas apresentaram-se entre 10,1°C e 15,2°C.

Na Tab. 12 são apresentados os resultados das análises de *Staphylococcus* coagulase positivo, de acordo com a temperatura de comercialização das carcaças (congeladas ou resfriadas). Para este parâmetro, não foram observadas diferenças entre os resultados encontrados ($P > 0,05$), ou seja, as estações do ano e as temperaturas de comercialização das carcaças, não influenciaram na contaminação destas por *Staphylococcus aureus*.

Tabela 12. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase positivo por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura da carcaça	Estação do ano (UFC/g)				Médias
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Congelada	$3,1 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$
Resfriada	$1,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
Média	$2,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	

Dados diferentes foram encontrados por Freitas et al. (2004). Em 58 (91,1%) das 61 amostras de carcaças de frango *in natura* analisadas (comercializadas em mercados públicos) e resfriadas (vendidas em supermercados) foi detectada a presença de estafilococos, sendo que 40 (65,0%) apresentaram *S. aureus* e 18 (31,0%)

Staphylococcus coagulase negativo. As contagens de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo variaram entre 10^1 a 10^6 UFC/g nas carcaças de frango *in natura*, e as carcaças de frango resfriadas apresentaram contagens inferiores de *S. aureus* havendo correlação direta entre a temperatura de

comercialização do produto e as contagens dessa bactéria.

O risco da ingestão de alimentos contaminados com altos índices de *Staphylococcus* coagulase negativo é grande, uma vez que existem relatos de os mesmos produzirem enterotoxinas (Freitas et al., 2004; Hennekinne et al., 2007; Ombui e Mathenge, 2007). Desta forma, considerando que a intoxicação estafilocócica é resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis, pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas

de *Staphylococcus* durante sua multiplicação no substrato, altas concentrações de *Staphylococcus* coagulase negativo alertam para um risco sanitário relevante, principalmente ao avaliarmos o potencial de estabilidade térmica das toxinas por eles produzidas.

Na Tab. 13 são apresentados os resultados das análises de *Staphylococcus* coagulase negativo, de acordo com a temperatura de comercialização das carcaças (congeladas ou resfriadas). Para esta variável, foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre as estações do ano e as diferentes temperaturas de comercialização.

Tabela 13. Contagens médias (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase negativo por estação e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura da carcaça	Estação do ano (UFC/g)			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Congelada	4,2 x 10⁵ Ba	3,5 x 10⁵ Aa	4,0 x 10 ³ Bb	1,2 x 10 ⁴ Bb
Resfriada	5,9 x 10 ⁴ Bb	8,9 x 10 ⁴ Bb	9,5 x 10 ⁴ Bb	4,0 x 10 ⁵ Bb

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Foi observado, ao estudar cada temperatura de comercialização separadamente, que, para as carcaças congeladas, as estações da primavera e do verão apresentaram os maiores valores de contaminação por *Staphylococcus* coagulase negativo, e os menores índices de contaminação foram observados durante as estações do outono e do inverno. Já para as carcaças resfriadas não foram observadas diferenças significativas entre as estações do ano ($P > 0,05$).

Das amostras isoladas do Ágar Baird Parker que se mostraram coagulase negativo, 94 foram identificadas, utilizando-se a análise bioquímica automatizada do sistema Vitek™2 (Anexo I). Destas, 49 foram identificadas como outras espécies de *Staphylococcus* e 45 como pertencentes a outros gêneros de micro-organismos (Tab. 14).

Tabela 14. Identificação bioquímica de *Staphylococcus* coagulase negativo e outros micro-organismos isolados no ágar Baird Parker à partir das carcaças produzidas no Estado de Minas Gerais

Gênero e Espécie	Coloração de Gram	Nº	%	
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Positivo	15	22,7
	<i>caprae</i>	Positivo	1	1,5
	<i>chromogenes</i>	Positivo	4	6,0
	<i>cohnii</i>	Positivo	1	1,5
	<i>epidermidis</i>	Positivo	3	4,5
	<i>equorum</i>	Positivo	1	1,5
	<i>hominis</i>	Positivo	1	1,5
	<i>lugdunenses</i>	Positivo	1	1,5
	<i>saprophyticus</i>	Positivo	5	7,6
	<i>sciuri</i>	Positivo	2	3,0
	<i>simulans</i>	Positivo	2	3,0
	<i>warneri</i>	Positivo	13	19,7
	Total			49
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	Positivo	1	2,1	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positivo	10	20,8	
<i>Enterococcus faecium</i>	Positivo	2	4,2	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Positivo	2	4,2	
<i>Granulicatella adiacens</i>	Positivo	3	6,3	
<i>Kocuria kristinae</i>	Positivo	9	18,8	
<i>Kytococcus sedentarius</i>	Positivo	1	2,1	
<i>Rothia mucilaginosa</i>	Positivo	4	8,3	
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	Positivo	1	2,1	
<i>Citrobacter freundii</i>	Negativo	1	2,1	
<i>Leclercia adecarboxilata</i>	Negativo	1	2,1	
<i>Pantoea</i> spp.	Negativo	1	2,1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	2	4,2	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negativo	2	4,2	
<i>Pseudomonas luteola</i>	Negativo	1	2,1	
<i>Shewanella putrefacium</i>	Negativo	1	2,1	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Negativo	2	4,2	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Negativo	1	2,1	
Total			45	

Dos *Staphylococcus* coagulase negativo, 15 foram identificados como *S. aureus*, mesmo apresentando resultados negativos na prova da coagulase. Estas colônias de *S. aureus* identificadas como coagulase negativo apresentavam características típicas de *Staphylococcus* coagulase positivo como colônias lisas, circulares, convexas, com dois a três mm de diâmetro, negras com anel duplo opaco ao redor da colônia e aspecto úmido (BAM, 2001). Apesar do ágar Baird

Parker ser considerado um meio de cultura seletivo para *S. aureus*, observou-se que as colônias isoladas neste ágar não eram apenas do gênero *Staphylococcus* e foi possível o desenvolvimento de outros gêneros de micro-organismos, inclusive Gram negativos. Foram isoladas 49 colônias de *Staphylococcus* spp., das quais 34 pertenciam a outras espécies que não *S. aureus*. Da mesma forma, foram isoladas 33 amostras de outros gêneros de micro-

organismos Gram positivo não *Staphylococcus* (Tab.14.) e 12 colônias de micro-organismos Gram negativo. De acordo com Brasil (2003), o ágar Baird Parker possui uma composição química que evidencia a habilidade desse micro-organismo em crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina, o que propiciaria uma seleção dos micro-organismos. No presente trabalho, observou-se que o ágar Baird Parker não apresenta a especificidade desejada, o que pode contribuir para resultados de *Staphylococcus* coagulase negativo contraditórios. Pode-se inferir, também, que a prova da coagulase não foi clara quanto à comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo micro-organismo, como era de se esperar, visto que algumas culturas se mostraram como coagulase negativo e, após alguns repiques, evidenciaram a capacidade de produzir a enzima coagulase.

Foram identificados micro-organismos pelo sistema Vitek™2 em gênero e quantidade bastante variados que não só os *S. aureus*. Apesar de existirem controvérsias quanto a especificidade do método pelo sistema Vitek™2 (Bem-Ami et al., 2005), e desconsiderando procedimentos equivocados de análises e interpretação por parte do analista, esta variedade encontrada pode ter sido devida ao fato de a carne de frango ser rica em nutrientes, como vitaminas do complexo B, aminoácidos essenciais, ferro e outros minerais, fundamentais para o desenvolvimento de uma variedade de micro-organismos (Venturini et al., 2007). A presença de patógenos, como a *Yersinia enterocolitica*

alerta para o risco sanitário quanto medidas sanitárias não são criteriosamente adotadas.

A identificação de uma microbiota diversificada na carcaça de frango, mostra que a superfície da carcaça do frango é um ambiente favorável a várias espécies de micro-organismos, incluindo patógenos, e que, uma vez instalados, poderão ser transmitidos entre carcaças e entre outros alimentos, por meio de contaminação cruzada.

Os índices encontrados no presente trabalho sugerem que a pesquisa de *Staphylococcus* spp. é fundamental na rotina de fiscalização, devendo ser adotada como uma ferramenta a mais para a avaliação da qualidade microbiológica das carcaças de frango utilizadas na alimentação humana.

5.5 Pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frango de corte

Dentre as 240 amostras de carcaças de frango analisadas, 218 (90,8%) apresentaram resultados negativos para *Salmonella* spp. e 22 (9,1%) apresentaram contaminação por este micro-organismo (Tab. 15).

Para este parâmetro, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as mesorregiões trabalhadas. Observou-se que não houve nenhuma amostra positiva na mesorregião do Campo das Vertentes. E, com relação às estações do ano, a coleta do inverno apresentou 13 amostras positivas (5,41%), seguida daquela do outono, com sete amostras positivas (2,9%). As estações do ano com menores índices foram primavera e verão, com uma amostra positiva (0,42%) em cada.

Tabela 15. Número de amostras positivas para *Salmonella* spp. em carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (número de amostras positivas)				Total
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	0	0	3	4	7
Campo das Vertentes	0	0	0	0	0
Oeste de Minas	1	0	0	3	4
Metropolitana	0	1	4	0	5
Triângulo Mineiro	0	0	0	6	6
Total	1	1	7	13	22

Quanto à temperatura de comercialização das carcaças, *Salmonella* foi mais detectada em amostras congeladas do que nas resfriadas (Tab. 16).

Tabela 16. Número de amostras positivas e negativas para *Salmonella* spp. por estação do ano e temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura	Estação do ano (número de amostras positivas)				Presença	Ausência
	Primavera	Verão	Outono	Inverno		
Congelado	1	1	5	9	16 (15,7%)	86 (84,3%)
Resfriado	0	0	2	4	6 (4,3%)	132 (95,7%)
Total	1	1	7	13	22	

Teste Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Foi observada uma associação entre os grupos experimentais e a temperatura de comercialização pelo teste de Qui-quadrado. A presença de *Salmonella* spp. está, portanto, associada à temperatura de comercialização da carcaça. Em carcaças congeladas, 15,7% apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., enquanto 84,3% foram negativas. Já nas carcaças resfriadas, apenas 4,3% destas foram positivas enquanto 95,7% foram negativas para este micro-organismo.

De acordo com Ray (1989) e Jay (2005), a maioria dos micro-organismos é destruída ou injuriada mais efetivamente na faixa de -2°C a -10°C do que a -15°C . A -30°C o efeito letal é ainda menos pronunciado. É o caso da carne de frango congelada, na qual 60% a 83% da *Salmonella* contaminante sobrevive em tratamento de congelamento a -20°C , após 126 dias, e apenas 1,3 a 5,8%

deste micro-organismo sobrevive após 5 dias a -2°C a -5°C (Massaguer, 2005).

Os índices de contaminação por *Salmonella* spp. encontrados no presente trabalho são menores que os encontrados por Uyttendaele et al. (1999) e Santos et al. (2000), que observaram 36,5% e 32% de carcaças positivas, respectivamente. Esta variação pode ser atribuída a diferentes sistemas de manejo ou condições de higiene.

Fuzihara et al. (2000) encontraram 42% das amostras de carcaças de frangos comercializadas no município de Mauá (SP) contaminadas por *Salmonella*. Porém, Mateus et al. (2003) encontraram apenas 5,9% das 102 amostras de frango coletadas do comércio varejista de Baurú (SP) contaminadas por este micro-organismo.

Observa-se uma grande variação de resultados encontrados na literatura. Como a

legislação brasileira não prevê a pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças e cortes de frango para consumo, a avaliação da real incidência no produto final fica comprometida. A Instrução Normativa (IN) n° 70 do MAPA (Brasil, 2003b) foi elaborada com a finalidade de conferir um controle minucioso sobre o processo de abate de frangos, através do monitoramento microbiológico, a fim de construir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção. Esta IN visa efetuar a verificação da prevalência da *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, a formação de um banco de dados para análise dos índices de contaminação nos produtos, o estabelecimento de padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação e do monitoramento constante do nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves.

Enquanto estas informações não se tornam consistentes, a presença de *Salmonella* em carcaças ainda será preocupante, diante do

risco de ocorrer a contaminação de outros alimentos durante a sua preparação em uma cozinha doméstica, seja pela contaminação direta e cruzada, seja pela maturação de biofilmes que podem, inclusive, propiciar a disseminação de outros patógenos aos alimentos (Lapidot et al., 2006). Diante deste exposto, apesar da legislação atualmente empregada não exigir a pesquisa de *Salmonella* spp. nas carcaças de frango na rotina, a mesma é desejável, a fim de auxiliar o sistema de inspeção e fiscalização de alimentos a avaliar se os mecanismos de controle deste patógeno estão sendo eficientes, e, desta forma, contribuir para a diminuição dos índices atualmente encontrados.

5.6 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em carcaças de frango de corte

Do total das amostras de carcaças de frango analisadas, 203 (85,6%) apresentaram-se como negativas para *Listeria monocytogenes* e 37 amostras (15,4%) foram positivas (Tab. 17).

Tabela 17. Número de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* em carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (número de amostras positivas)				Total
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	4	2	7	1	14
Campo das Vertentes	1	0	0	0	1
Oeste de Minas	3	9	2	0	14
Metropolitana	3	0	0	4	7
Triângulo Mineiro	0	0	0	1	1
Total	11	11	9	6	37

Em relação às mesorregiões trabalhadas, não houve diferença significativa nas amostras analisadas ($P > 0,05$). Porém, observou-se um maior número de amostras positivas na mesorregião Sul e Sudoeste de Minas Gerais, contribuindo com 37,8% delas.

Observou-se também que *L. monocytogenes* está amplamente distribuída pelo Estado, tendo sido possível identificá-la em todas as mesorregiões pesquisadas.

Carcaças de frango analisadas nas estações da primavera e do verão apresentaram o

mesmo índice de contaminação, sendo maiores que as demais estações. O inverno foi a estação que apresentou menor índice. Porém, os índices de positividade de *L. monocytogenes* encontrados neste trabalho evidenciaram que houve uma distribuição homogênea durante todas as estações do ano.

É importante avaliar o processo tecnológico de produção de cada estabelecimento, a fim de se identificar possíveis pontos de contaminação ou recontaminação, considerando a habilidade de *L. monocytogenes* em formar biofilmes e, desta

forma, se propagar indefinidamente dentro de uma indústria.

Quanto à temperatura de comercialização das carcaças, foi possível verificar que não houve associação entre os grupos experimentais pelo teste de Qui-quadrado (Tab. 18). O índice de positividade foi muito similar entre carcaças congeladas e resfriadas, contribuindo com 15,7% e 19,4%, respectivamente, para o total de amostras analisadas. Portanto, observa-se que a temperatura de comercialização não influenciou a incidência de *L. monocytogenes* em carcaças de frango.

Tabela 18. Número de amostras positivas para *Listeria monocytogenes* por estação do ano e por temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura	Estação do ano (número de amostras positivas)				Presença	Ausência
	Primavera	Verão	Outono	Inverno		
Congelado	2	6	6	2	16 (15,7%)	86(84,3%)
Resfriado	9	5	3	4	21 (19,4%)	117 (80,6%)
Total	11	11	9	6		

Até o momento, não existe legislação brasileira que submeta a carne de frango à pesquisa de *L. monocytogenes*. Também, não há nenhum programa governamental que contemple o controle deste micro-organismo dentro de frigoríficos/abatedouros e comércio. Como se trata de um micro-organismo ubíquo que possui diversos mecanismos de virulência (López et al., 2008), é bastante preocupante sua incidência em alimentos, mesmo naqueles que serão submetidos ao cozimento. É possível que a contaminação da carcaça de frango aconteça em função do contato com superfícies contaminadas, uma vez que *L. monocytogenes* já foi encontrada em várias superfícies como aço inoxidável, utensílios de transporte, luvas de manipuladores, água de lavagem, dentre outros (Lawrence e Gilmour, 1994).

O número de amostras positivas neste trabalho foi inferior ao encontrado por Antunes et al. (2002). Estes autores observaram que o índice de positividade para *L. monocytogenes* em carcaças de frango comercializadas em Portugal foram de 41% (26 em 63). Já para Mena et al. (2004), o índice encontrado nas carcaças comercializadas em Portugal foi de 60%.

Chiarini (2007) mostrou que, entre os abatedouros de frango com evisceração automática e evisceração manual, o número de amostras positivas para *L. monocytogenes* foi maior naqueles com evisceração automática (20,1% e 16,4%, respectivamente). Pode-se inferir que *Listeria* suporta condições adversas mais facilmente que outros micro-organismos (Skadamis et al., 2007) e que mesmo indústrias mais tecnificadas e com uma

rotina de higienização bem estruturada não estão livres da contaminação por este micro-organismo.

A forma de contaminação das carcaças de frango por *L. monocytogenes* ainda não foi completamente esclarecida. Porém, admite-se a hipótese de que ocorra, principalmente, nas últimas fases do processamento. Contudo, após a contaminação desta carcaça, a mesma poderá contaminar os instrumentos e toda a linha de abate o que, posteriormente, levará à contaminação de um elevado número de carcaças abatidas em seguida (Cox et al., 1997; Göksoy et al., 2004; Barbalho et al., 2005; Veloso, 2007).

Considerando a distribuição uniforme de *L. monocytogenes* nas carcaças de frango comercializadas no Estado de Minas Gerais e sendo o seu índice superior ao das *Salmonella* spp., este micro-organismo passa a ser um importante patógeno na cadeia de produção da carne de frango e que deve ser monitorado na rotina da fiscalização e

inspeção, além da necessidade de criação e implementação de medidas de controle por parte dos órgãos regulatórios, com o objetivo de minimizar o risco de contaminação cruzada de forma a garantir, assim, a saúde pública.

5.7 Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte

Das 240 amostras analisadas neste trabalho, apenas cinco (2,08%) apresentaram resultado positivo para *Campylobacter jejuni* (Tab. 19).

Não houve diferença significativa entre as amostras analisadas ($P > 0,05$). Observou-se a presença deste micro-organismo em apenas duas mesorregiões, a do Oeste de Minas e a do Triângulo Mineiro. Observou-se também que, no inverno, a incidência foi maior (três amostras) e que no outono não foi detectada a presença de *Campylobacter* spp. nas carcaças analisadas.

Tabela 19. Número de amostras positivas para *Campylobacter* spp. em carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais, por estação e por mesorregião

Mesorregião	Estação do ano (número de amostras positivas)				Total
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
Sul e Sudoeste	0	0	0	0	0
Campo das Vertentes	0	0	0	0	0
Oeste de Minas	1	1	0	1	3
Metropolitana	0	0	0	0	0
Triângulo Mineiro	0	0	0	2	2
Total	1	1	0	3	5

Na Tab. 20 são apresentados os resultados das análises de *Campylobacter* spp. de acordo com a temperatura de comercialização das carcaças (congeladas ou resfriadas). Na estação do verão e na estação da primavera, não houve amostras positivas para carcaças congeladas e carcaças

resfriadas, respectivamente. Não foi observada uma associação entre os grupos experimentais pelo teste de Qui-quadrado.

Foi verificada uma porcentagem de positividade semelhante entre as carcaças congeladas e resfriadas (2,0% e 2,2% respectivamente).

Tabela 20. Número de amostras positivas para *Campylobacter* spp. por estação do ano e temperatura de comercialização das carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais

Temperatura	Estação do ano (número de amostras positivas)				Presença	Ausência
	Primavera	Verão	Outono	Inverno		
Congelado	1	0	0	1	2 (2,0%)	100 (98,0%)
Resfriado	0	1	0	2	3 (2,2%)	135 (97,8%)
Total	1	1	0	3		

Nas 235 (97,92%) amostras consideradas negativas pela metodologia ELFA, mostraram resultados cujos valores estavam

abaixo do limite de quantificação do método e que precisam ser melhor investigados (Tab. 21).

Tabela 21. Presença de *Campylobacter jejuni* em 240 amostras de frangos coletadas em abatedouros do Estado de Minas Gerais

Resultado interpretado pelo equipamento Vidas 30	Número de amostras identificadas	Valor do Teste	Porcentagem %
Negativo	10	0,03	4,17
	100	0,04	41,67
	121	0,05	50,42
	03	0,06	1,25
	01	0,08	0,42
Positivo*	01	0,12	0,42
	01	0,14	0,42
	01	0,19	0,42
	01	0,39	0,42
	01	0,59	0,42

*Resultados positivos: amostras com valores acima do limite de quantificação do método ($\geq 0,10$).

A impossibilidade de enumerar o micro-organismo na maioria das amostras examinadas pelo método utilizado pode ser explicada por algumas hipóteses. *Campylobacter*, quando em condições de injúria, sofre alterações morfológicas, passando da forma original de espiroqueta móvel para cocóide. Essas formas não são cultiváveis em meios de cultura, porém, são infectivas. Desta maneira, pode-se inferir que as células do patógeno poderiam estar injuriadas, devido ao processo de congelamento, assumindo a forma viável,

porém não cultivável (VNC). Segundo Mead et al. (1999), células VNC não são passíveis de recuperação pelos métodos tradicionais, mas mantém sua capacidade de causar doença.

Células injuriadas de micro-organismos de importância para a saúde pública em função de temperaturas de comercialização da carcaça podem estar presentes nas carcaças mas escaparem da detecção por não serem hábeis para se desenvolver em meios seletivos. O potencial para risco é

preocupante pelo fato de ainda serem capazes de retomar suas habilidades. Muitos métodos rápidos para detecção de patógenos do alimento estão comercialmente disponíveis. Porém, o limite de detecção é tal que eles requerem um estágio de enriquecimento e testes primários, para permitir a multiplicação do organismo alvo. As condições de enriquecimento são particularmente importantes quando testadas em amostras de alimentos nos quais células injuriadas podem estar presentes. Entretanto, muitos métodos rápidos que recomendam o uso de enriquecimento seletivo direto com ou sem temperatura de incubação elevada podem gerar resultados falso negativos. A incorporação de um estágio de ressuscitação usando meio de pré-enriquecimento não seletivo ou outro método de recuperação efetivo melhora as taxas de detecção destes métodos de ensaio. Diante disso, procedimentos de recuperação adequados poderiam ser incorporados aos métodos de detecção e enumeração rotineiros e adotados por razões regulatórias e de controle de qualidade, para garantir que um resultado microbiológico coerente seja alcançado. Porém, é importante frisar que qualquer modificação em técnicas reconhecidas atualmente deverão ser validadas e submetidas à apreciação de órgãos competentes para, só então, serem adotadas na rotina de um laboratório oficial para fins de fiscalização.

A liberação de amostras falso-negativas (não detectadas na análise, porém contaminadas) para comercialização representa um perigo potencial à saúde, já que um lote de alimento pode ser liberado devido à não detecção de patógenos. Desta forma, o método ELFA, empregado para a pesquisa deste patógeno, considerando o protocolo utilizado, não é recomendado como método de triagem para carcaças de frangos, uma vez que pode apresentar resultados falso-negativos, precisando ser confirmado por outras

metodologias, caso o laboratório decida utilizá-lo. Os resultados encontrados no presente estudo indicam que, apesar de prática e rápida, a metodologia ELFA, pode subestimar a contaminação real de amostras submetidas a baixas temperaturas, uma vez que não recupera as células injuriadas, seja por resfriamento, seja por congelamento.

Meldrum e Wilson (2007) utilizaram a técnica de plaqueamento direto para a pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras frescas e submetidas a baixas temperaturas e encontraram 71,9% das amostras de frango congeladas positivas para *Campylobacter* spp. Semelhantemente ao presente estudo, os autores não encontraram diferenças significativas na taxa de positividade do *C. jejuni*, entre as amostras resfriadas e congeladas.

Lee et al. (1998) comprovaram que *C. jejuni* é hábil em sobreviver por longos períodos (56 dias) armazenado em temperaturas inferiores a -20°C (temperatura da maioria dos congeladores domésticos) demonstrando que durante este período o micro-organismo pode manter-se viável sendo um risco para a saúde pública. Já Alter et al. (2005) avaliaram em um experimento 43 amostras de peru e verificaram uma redução significativa na taxa de positividade (de 67,4% para 25,6%) das amostras após o resfriamento entre 0°C e 3 °C por 24h. Georgsson et al. (2006), avaliaram a contaminação de carcaças de frangos por *Campylobacter* no momento da coleta e após 31 dias de estocagem à -20 °C, utilizando a técnica de plaqueamento direto. Estes autores verificaram uma redução nas contagens de *Campylobacter* de 0,65 a 2,87 Log₁₀ UFC/g após os 31 dias de estocagem, permanecendo os índices de contaminação após este período na faixa de 3,13 a 4,01 Log₁₀ UFC/g.

Os resultados obtidos em trabalhos como os de Lee et al. (1998) e de Meldrum (2005) indicam que não existe diferença na taxa de positividade em amostras de carnes de frango refrigeradas e congeladas demonstrando que uma porção significativa de *C. jejuni* sobrevive em ambas condições. Esses resultados alertam que estas condições, isoladamente, não garantem a segurança do alimento, com respeito a este micro-organismo.

Os resultados desse trabalho mostram alto índice de negatividade de *Campylobacter jejuni*, em amostras de carcaças de frangos colhidas diretamente das indústrias avícolas, localizadas no Estado de Minas Gerais, utilizando o teste imunoenzimático ELFA no sistema automatizado VIDAS® 30. Porém, considerando a literatura e a propósito de leituras detectando valores abaixo do limite de quantificação do método, esta negatividade suscita a necessidade de técnicas mais sensíveis, como as metodologias moleculares, para pesquisa de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas.

Os órgãos de fiscalização devem atentar para o risco de contaminação cruzada entre a carcaça de frango e seus respectivos cortes e subprodutos com outros alimentos. A legislação vigente deve considerar, além dos padrões atualmente empregados, a prática de análises regulares para determinar a ausência de *Campylobacter* spp. e de outros patógenos. Portanto, deve ser elaborado e implementado um programa de redução de patógenos pelos órgãos de fiscalização para controle de *Campylobacter* spp., nos mesmos moldes que o “Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico - Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus”, de forma a mapear o comportamento do micro-organismo neste alimento e, a partir de então, elaborar padrões qualitativos e

quantitativos de aceitabilidade da contaminação neste produto.

Apesar dos índices baixos de amostras positivas para *Campylobacter* spp., os resultados encontrados neste trabalho apontam para a fragilidade da metodologia empregada e alertam para um risco sanitário relevante.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa mostram que é possível concluir que a temperatura de comercialização não influencia na qualidade microbiológica das carcaças de frango, com exceção da *Salmonella* spp. e que não há diferenças entre os perfis microbiológicos nas carcaças de frango produzidas nas diferentes mesorregiões do Estado de Minas Gerais. As carcaças de frango produzidas no Estado de Minas Gerais apresentam contagens de coliformes a 35°C e a 45°C acima dos valores permitidos pela legislação, e mostram, também, contaminação por *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A presença desses micro-organismos representa riscos de contaminação cruzada e conseqüente risco para o consumidor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-RAOUF, U.M.; AMMAR, M.S.; BEUCHAT, L.R. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, p.423-426. 1996.
- ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; et al. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potencial isolated from table eggs. *Food Res. Int.*, v. 39, p. 212-219, 2006.
- ÁFRICA. Agricultural products standards act 119, 1990. *Standards and requirements*

- regarding poultry meat exports. Department of Agriculture of South Africa. 23 ago. 1991.
- AHLBORN, G.; SHELDON, B. W. Enzymatic and microbiological inhibitory activity in eggshell membranes as influenced by layer strains and age and storage variables. *Poultry Science*, v. 84, p. 1935-1941, 2005.
- AKKAYA, L; ATABAY, H.I.; KENAR, B. et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*, v. 50, p. 513-516, 2006.
- ALLEONI, A. C. C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Sci. Agric.*, v. 63, n. 3, p. 291-298, 2006.
- ALONSO, M.Z.; LUCCHESI, P.M.A.; RODRIGUEZ, E.M. et al. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*, v.23, p. 351-355, 2012.
- ALTER, T.; GAULL, F.; FROEB, A.; FEHLHABER, K. Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. *Food Microbiology*, v. 22, p. 345-351, 2005.
- ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B.; JAYME, V. S.; ROCHA, P. T.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiana, Goiás, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 5, n. 4, p. 221- 228, 2004.
- ANDREATTI FILHO, R.L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. *Revista de Educação Continuada. Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV-SP)*, v. 4, p. 90-101, 2001.
- ANTUNES, P.; REU, C.; SOUSA, J.C.; PESTANA, N.; PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 12, p. 1888-1893, 2002.
- AOAC Official Method. Aerobic count plate, dry rehydratable film Petrifilm™ aerobic plate method. *J. AOAC Int.*, v. 83, p.635, 1990.
- AOAC Official Method. Detection and quantification of yeast and molds in foods - Simplate Yeast and Mold Color Indicator (Y&M - CI). 2002.11. *J. AOAC Int.*, v. 86, n. 2, 2003.
- AOAC Official Method. *Evaluation of VIDAS Listeria monocytogenes II (LMO2) Immunoassay Method for the Detection of Listeria monocytogenes in Foods*. 2004.02. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 2005, 18th Ed., v.88, n° 3, Chapter 17, p.233-234, 2004.
- AOAC Official Method. Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E.coli* in foods - Simplate Coliform and *E.coli* Color Indicator. 2005.03. *J. AOAC Int.*, v.88, p.1318, 2005a.
- AOAC Official Method. *Escherichia coli* O157:H7 in Selected Foods. 2005.04. *Journal of AOAC International*, v. 88, p.1334, 2005b.
- AOAC Official Method. *Salmonella* in Foods, *Enzyme-linked immunofluorescent assay screening method (VIDAS Salmonella [SLM] Assay* (bioMerieux Vitek, SA, 595 Anglum Drive, Hazelwood, MO 63042, USA). 18th Ed., Chapter 17, 17.9.14A, p. 139-141, 2005c.
- ARÁBIA SAUDITA. Registration of facilities Involved in processing, cutting, manufacturing & packaging chilled & frozen (Bovine, Camel, Sheep, Goat, Deer and

- syndrome: an emerging infectious disease. *Annu. Rev. Med.* v.50, p.355-367, 1999.
- BETTELHEIM, K. A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*, Washington, v. 95, n. 1, p. 205-217, 2003.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H. et al. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)- producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J.Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2483-2488, 1993.
- BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. São Paulo, Melhoramento, 22ª edição, 1982.
- BIOMERIEUX. Vidas®*Campylobacter* (CAM). Ref.30.111, 07999 H – PT – 2007/09.
- BIOMERIEUX. Vidas®*E.coli* O157 (ECO). 07292 O – PT – 2010/09.
- BIOMERIEUX. Vitek 2 – Technology, 398p. 510773 – 5PT1 – 2008/06.
- BLACK, R.E., LEVINE, M.M., CLEMENTS, M.L. et al. Experimental *Campylobacter jejuni* in humans. *J. Infet. Dis.* v.157. p. 472-9. 1998.
- BLASER, M. E. RELLER, L. B. *Campylobacter enteritis*. N. ENGL., v. 305, p.1444-1452, 1981.
- BOARD, R.G.; FULLER, R. *Microbiology of the Avian Egg*. 1 ed. London: Editora Chapman e Hall, 181 p. 1994.
- BOERLIN, P.; MCEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F. et al. Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *Clin. Microbiol.*, v.37, p. 497-503, 1999.
- BOURGEOIS, C. M.; MESCLE J. F.; ZUCCA, J. *Microbiología alimentaria*. Aspectos microbiológicos. Aspectos microbiológicos de la sanidad y calidad alimentaria. Acribia Zaragoza, v.1, 437p, 1994.
- BOVILL, R.A.; MACKEY, B.M. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, v.143, n.5, p.1575-1581, 1997.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia. *BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa*. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e alterações*. DOU. Brasília atualizado em 1997. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 15 de Maio de 2010, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria nº 01 de 21 de fevereiro de 1990. Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados*. Brasília, 1990.
- BRASIL, Ministério da Agricultura - *Portaria SDA. N.126, de 06 de novembro de 1995*. Diário Oficial da União, Brasília, DF. MAA. Normas para diagnóstico das Salmoneloses aviárias, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF,. Seção 1, p. 46-53, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.39 de 8 de fevereiro de 2002. *Regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados*. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*. Brasília, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de Salmonella sp. em Carcaças de Frangos e Perus*, 2003. Diário Oficial da União de 10 out. 2003, seção 1, p. 9, 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13, de 02 de janeiro de 2001. *Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília. (2001a). DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigilância Epidemiológica das doenças de transmissão hídrica e alimentar – VEDTHA*. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf>. Acesso em 15 de novembro de 2012, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível

em:<<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em 12 de janeiro de 2013.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Volume 2. New York: Spring Science + Business Media Inc., 2005.

BHUNIA, A. K. *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis*. Purdue University, p. 217-225, 2008.

BUSTA, F.F. Practical implications of injured microorganisms in food. *J. Milk Food Technol.*, v. 39, p. 138–145, 1976.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

CAMBELL, G.R.; PROSSER, L.; GLOVER, A. et al. Detection of *E.coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 1004-1010, 2001.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Chapter 11, Export, South Africa. 2011a. Disponível em <www.inspection.gc.ca/english/fssa/meavia/man/ch11/coupay/safric-afrique.shtml>. Acesso em: 01 dez. 2012.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Eggs and Egg Products. 2011b. Disponível em <<http://www.inspection.gc.ca/food/eggs-and-egg-products/eng/1299796526271/1299796885258>>. Acesso em 16 abril 2013.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCIA-FERNANDEZ, M. C.; MORENO, B. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. *Poultry Science*, v. 81, nº 3, p. 414-421, 2003.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, N. A. M. I.; GAMA, M. S. Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no

laboratório de patologia avícola de Descalvado. *Arq. Instit. Biol.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 19-22, 2001.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online], v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.

CARVALHO, A.C.; FLORIOTO, J.F.; PEREIRA, G.T. Avaliação microbiológica da carne de ave mecanicamente separada. *Higiene Alimentar*, v.16, n.98, p.91-100, 2002.

CARVALHO, J. C. A. P.; MANO, S.; CUNHA, F. L.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Pesquisa de *Salmonella* Enteritidis em ovos em casca. *R. Bras. Ciênc. Vet.*, v. 13, n. 2, p. 106-108, 2006.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseaseinfo/Campylobacter_g.htm> Acesso em: 01-06-2010.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). Disponível em <<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO104/index.html>> Acesso em 08-08-2012.

CHAPMAN, P.A.A.; SIDONS, C.A.; CERDAN MAIO, A.T. et al. A1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol. Infect.*, v. 119, p. 245-250, 1997.

CHATURONGAKUL, S.; RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in microbiology*, v. 16, n° 8, p. 388-396, 2008.

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento*

de sua disseminação. Tese para obtenção de título de doutor. Universidade de São Paulo, 141 p, 2007.

CHINEN, I.; EPSZTEYN, S.; MELAMED, C.L. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* v.132, p. 167-171, 2009.

CHIU, C.H.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y. Y.; WANG, H. S.; LEE, Y. S. The genome sequence of *Salmonella* enterica sorovar Cholerasuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n° 5, p. 1690-1698, 2005.

COCKER, A. O. et al. Human campylobacteriose in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 0, n° 8, p. 237-242, 2002.

COOK, A.; ODUMERU, J.; LEE, S.; POLLARI, F. *Campylobacter, Salmonella, Listeria monocytogenes, Verotoxigenic Escherichia coli, and Escherichia coli* Prevalence, Enumeration, and Subtypes on Retail Chicken Breasts with and without Skin *Journal of Food Protection*, Volume 75, n° 1, p. 34-40(7), 2012.

COOKSON, A.L.; TAYLOR, S.C.; BENNETT, J. et al. *Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing Escherichia coli form cattle and sheep in lower North Island, New Zealand*. *N.Z. Vet. J.*, v. 54, p. 78-84, 2006.

CORPE, W.A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: *Adsorption of microorganisms to surfaces*. G. Bitton and K.C. Marshal (Eds), John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, pp.105-144, 1980.

- COUTINHO, C. I. *Análise microbiológica da carne de frango crua após o processo de moagem*. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em nutrição) - Faculdade Assis Gurgacz. 2007.
- COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E. The Presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. *JJ. Appl. Poultry Res.*, v. 6, p. 116-119, 1997.
- D'AOUST, J. ; MAURER, J. ; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, Editores. *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2th ed. Washington: American Society for Microbiology, v. 7, p.141-77, 2001.
- DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves. In: *SEMANA ACADÊMICA VETERINÁRIA*, n. 8, 1998, São Paulo: p. 71-77, 1998.
- DIAS, D. A. M. *Persistência de cepas de Listeria monocytogenes em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 84 p., 2008.
- DICKINS, M.A.; FRANKLIN, S.; STEFANOVA, R.; SCHUTZE, G.E.; EISENACH, K.D.; WESLEY, I.; CAVE, M.D. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection*, v.65, n.6, p.957-962, 2002.
- DOMÍNGUEZ, C.; GOMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, v.72, n.1/2, p.165-168, 2002.
- DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiol.*, p. 2394-2396. 1987.
- DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, n° 3, 2009.
- DONADO-GODOY, P., CLAVIJO, V., LEÓN, M., TAFUR, M. A., GONZALES, S., HUME, M., ALALI, W., WALLS, I., LO F. O., WONG, D. M., DOYLE, M.P. Prevalence of *Salmonella* on retail broiler chicken meat carcasses in Colombia. *J Food Prot.*, v. 75(6), p. 1134-1138, 2012.
- ETHELBERG, S.; OLSEN, K.E.; SCHEUTZ, F. et al. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 10, p. 842-847, 2004.
- EUZÉBY, J. P. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acessado em 06 de junho de 2012.
- FAVRIN SJ, JASSIM SA, GRIFFITHS MW. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. *Appl Environ Microbiol.*, v. 67(1), p. 217-24, 2001.
- FDA Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 1992* (Bad Bug Book). Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>>. Acessado em 06 de junho de 2012.
- FIGUEIREDO, T. C. *Influência das condições e do período de armazenamento nas características físico-químicas, microbiológicas e nos níveis de amins*

bioativas em ovos para exportação. Tese (doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 113 p. 2012.

FIGUEIREDO, T. C. *Características físico-química e microbiológica e aminos bioativas em ovos de consumo*. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, T. C.; VIEGAS, R.P.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; SOUZA, M. R.; HENEINE, L. G. D.; CANCADO, S. V. Bioactive amines and internal quality of commercial eggs. *Poultry Science (Print)*, v. 92, p. 1376-1384, 2013.

FORSYTHE, S. *Microbiologia da segurança alimentar*. Artmed Editora, 2002.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F. A.; ROSA, C. A. R. Isolamento de fungos de ovos tipo comercial. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.29, n.1, p.37-38, 2007.

FRANCO, B. D. G. M. F; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. In: LANDGRAF, M. Microorganismos indicadores. Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R.V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *British Poultry Science*, v.48, n.2, p.127-132, 2007.

FRAZIER, W. C. *Microbiologia de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 681p, 1993.

FREITAS, M. F. L. de; LEÃO, A. E. D. de S.; STAMFORD, T. L. M.; MOTA, R. A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. *B.CEPA*. Curitiba, v.. 22, p. 227, julho a dezembro, 2004.

FREITAS, M F. L.; LUZ, I. S.; , PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; Detecção de genes

toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 29, p.375-379, 2009.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protectio.*, v. 63(12), p. 1749-1753, 2000.

GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella spp. em aves de postura comercial*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, 2001.

GAST, R.K., HOLT, P.S. The relationship between the magnitude of the specific antibody response to experimental *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens and their production of contaminated eggs. *Avian Dis.* 45:425-31, 2001.

GEORGSSON, F.; PORKELSSON, A.; GEIRSDÓTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N.J. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology.*, v. 23, p. 677-683, 2006.

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE, C.M.; KAY, W.W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology-Sgm*, v.153, p.1131-1140, 2007.

GOH, S. G.; KUAN, C. H.; LOO, Y. Y.; CHANG, W. S.; LYE, Y. L.; SOOPNA, P.; TANG, J. Y. H.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; AFSAH-HEJRI, L.; SON, R. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poultry Science*, v. 91, p. 2686-2690, 2012.

GÖKSOY E., KIRKAN S.; KÖK F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in

- turkey. *Poultry Science*, v. 83, p. 1427–1432, 2004.
- GONÇALVES, P.M.R. *Isolamento e identificação de Listeria spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologias e fatores interferentes*. Niterói, RJ, 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.
- GOUIN, E.; MENGAUD, J., COSSART, P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infection and Immunity*, v.62, n. 5, p. 3550-3553, 1994.
- GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases* – www.cdc.gov/eid, v. 14, n° 5, p. 734-740, 2008.
- GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS, P.I., BOCKEMUHL, J., GRIMONT, P.A.D., WEILL. Supplement 2003-2007 (N° 47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 26-29, 2010.
- GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Anim. Sci.* 2007. 85:E45-E62, 2007.
- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; JANKE, B. et al. Pathogenicity Islands of Extraintestinal *Escherichia coli*. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. p. 59-76. 1999.
- HAMMACK, T. S.; SHERROD, P. S.; BRUCE, V. R. et al. Research note: Growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poult. Sci.*, v.72, p.373-377, 1993.
- HARTSELL, S.E. The longevity and behavior of pathogenic bacteria in frozen food: the influence of plating media. *Am. J. Public Health*, v. 41, p. 1072–1077, 1951.
- HENNEKINNE, J. A.; GUILLIER, F.; PERELLE, S.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S.; KRYS, S.; LOMBARD, B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1261–1272, 2007.
- HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.L.; DRAGACCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins*, v. 2, n. 8, p. 2106-2116, 2010.
- HINCKE M. T. et al. Identification and localization of Lysozyme as a component of eggshell matrix. *Matrix Biol.Stuttgart*, v. 19, n. 05, p. 443 – 453, 2000.
- HUALLANCO, M. B. A. *Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito pós abate da qualidade de cortes de frango criados no sistema alternativo*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- HUMPHREY, T.J.; PATH, M.R.C. The infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* PT4 and factors which influence egg contamination. In: SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND *SALMONELLOSIS'97*, Poufragan, França. Proceedings, p.305–311, 1997.
- HUMPHREY, T. J.; O' BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic

- pathogens: a food production perspective. *Internacional Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 237- 257, 2007.
- ICMSF. *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens*. London, Blackel Academic & Professional, p.513, 1996.
- JABLONSKI, L.M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, and T.J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press, 1997.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 790 p, 2005.
- JAY, J.M. *Gastroenterite de origem alimentar causada por Escherichia coli*. In: *Microbiologia de Alimentos*. Ed. ArtMed. Cap.27, p.656-582, 2005.
- JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D.R.A.; BOLTON, F.J.; FROST, J.A.; WARD, L.; HUMPHREY, T.J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp.. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*., v. 76, p. 151-164, 2002.
- KEENER, M.K. *Campylobacter in Poultry Processing – a Continuing Challenge*. Department of Food Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 2004.
- KELLER, L. H.; BENSON, C. E.; KROTEK, K.; ECKROADE, R. J. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 7, p. 2443-2449, 1995.
- KERR, S.; BALL, H.J.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, D.A.; FINLAY, D.A. Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*. *Journal Applied Bacteriology*, v. 72, p. 302-308, 1992.
- KLEIN, R. W. T. *Avaliação da qualidade interna de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento*. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- KLOOD, W. E.; SCHLEIFER, K.H.; GÖTZ, F. The genus *Staphylococcus*. In: *The prokaryotes*, 1369-1420. Edited by Blows, A. & Truper, H.G., Springer, New York, 1991.
- KOLUMAN, A.; UNLU,T.; DIKICIA.; TEZEL, A.; AKCELIK, E. N.; BURKAN, Z.T. *Presence od Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins in different foods*. Kafkas Univ. Vet. Fak Derg., v. 17, p.55 – 60, 2011.
- KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11, parte 1, 2001.
- KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.18, n.3, p.775-779, 1977.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, .T.P.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. *Avian Diseases* , v.52, n.4, p.680–684, 2008.
- LANGONI, H.; PRADO, R. A. T.; PINTO, J. P. A. N. et al. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos no comércio de Botucatu – SP. *Rev. Hig. Alim.*, v.9, p.45-47, 1995.

- LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, v.109, n.3, p.229-233, 2006.
- LAWRENCE, L.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60,12, p. 4600-4604, 1994.
- LAX, A. J.; BARROW, P. A.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Current perspective in salmonellosis. *British Veterinary Journal*, v. 151, n° 4, p. 351-377, 1995.
- LEE, A.; SMITH, S.C.; COLOE, P.J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, v.61, n.12, p.1609–1614, 1998.
- LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG,I.G. et al. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology* v.134 p. 196–200. 2009.
- LEHNINGER, A. L. *Lehninger principles of biochemistry*. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2004.1119 p.
- LEITE, A. M. O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.13(2), p.80–83, 2006
- LEVINE, M.M., XU, J.G., KAPER, J.B., et al. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotype that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *The Journal of Infectious Disease*. v.156, n.1,p, 175-182, 1987.
- LIMA, A. L. *Prevalência de E.coli O157:H7 e linhagens produtoras de toxina do tipo shiga em carcaças de frango de corte abatidas no Estado de Minas Gerais*. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical Reviews in Poultry Biology*. v.2 (1), p.21-59, 1989.
- LIU,D.; AINSWORTH, F.; AUSTIN, F.; LAWRENCE, M. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *Jornal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 1065-1070, 2003.
- LIU, D.; AINSWORTH A.; FRANK, A.; AUSTIN, F.; LAWRENCE, M. Use of PCR primers derived from putative transcriptional regulator gene for species – specific determination of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, p. 297-304, 2004.
- LOPES, M.; GALHARDO, J. A.; OLIVEIRA, J. T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S. F.; MULLER, E. E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de ave. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 3, p. 465-476, 2007.
- LÓPEZ, V.; SUÁREZ, M.; CHICO-CALERO, I.; NAVAS, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J. *Listeria monocytogenes* en alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología*, v. 8, (4), p. 224-234, 2006.
- LÓPEZ, V.; ORTIZ, S.; CORUJO, A.; LÓPEZ, P.; POSA, D.; NAVAS, K.; MORENO, R.; MARTINEZ-SUARES, J. Different Contamination Patterns of Lineage

- I and II Strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish Broiler Abattoir. *Poultry Science*, v. 87, p. 1874-1882, 2008.
- LOUISE, C.B.; KAYE, S.A.; BOYD, B. et al. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 2766-2769, 1995.
- MADIGAN, M.t.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. BROCK: *Biology of microorganisms*, 10th Ed. Prentice-Hall, New Jersey, p. 1019, 2004.
- MAGALHÃES, A. P. C. Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de embalagem e tempo de armazenamento. *Seropédica*, RJ. 55 p. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2007.
- MAROSO, M. T. D. *Efeito da redução de temperatura de carcaças de frango na multiplicação de microorganismos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 69 p., 2008.
- MASSAGUER, P. R. *Microbiologia dos processos alimentares*. São Paulo, Livraria Varela, 258 p, 2005.
- MATEUS, D.P.; RUDGE, A.C.; GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* no município de Baurú, S.P., Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62 (92), p. 111-115, 2003.
- MCLAUHLIN, J.; MITCHELL, R.; SMERDON, W.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 92, p. 15-33, 2004.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infections Diseases*, v. 5, p. 607-625, 1999.
- MELDRUM, R.J.; WILSON, I.G. *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. *Journal of Food Protection*, v.70, n.8, p.1937-1939, 2007.
- MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, Amsterdam, v. 21, p. 213-216, 2004.
- MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L. A.; RODRIGUES, D.; BRENNER, F. H.; BLAKE, P.; TAUXE, R.V. Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infection in the United States, 1985-1991. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 169, n° 3, p. 547-552, 1994.
- MORRIS, G. K. *Salmonella* Enteritidis and eggs: assessment of risk. *Dairy, Food Environ. Sanit.*, v.10, p.279-281, 1990.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. *Food Microbiology: fundamental and frontiers*. 3.ed. Washinton: ASM Press, p.237-248, 2007.
- NEWELL, D.G. *Campylobacter's in Poultry: Epidemiology, ecology and the potential for control up to the point of slaughter*. Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, UK, 2004.
- O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R. et al. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal Infection Disease* v.146, p.763-769, 1982.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES [OIE] e Center for Food Security and Public Health – Iowa State

- University. Listeriosis. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>, 2005.
- OLIVEIRA, A.; L OLIVEIRA, R. B. P. *Enumeração de Campylobacter spp. e presença de Campylobacter jejuni em carcaças de frango no Estado de Minas Gerais*. Ciência Rural, Santa Maria Online, 5p. 2012.
- OLIVEIRA, A. V. B.; SILVA, R. A.; ARAÚJO, A. S.; BRANDÃO, P. A.; SILVA, F. B. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. *Revista Verde* (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.3, p. 01 – 16, 2011. Disponível em: <<http://revista.gvaa.com.br>>. Acessado em 28 de agosto de 2012.
- OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.6, p. 655-661, 2000.
- OLIVEIRA, S.J. *Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária*. Ed. da Ulbra: Canoas, RS, 142p, 1995.
- OMBUI, J.N.; MATHENGE, J.M. A Comparison of the Reverse Passive Latex Agglutination and Enzyme Linked Immunosorbent Assay Techniques for Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *A Journal of the Kenya Veterinary Association*, Nairobi, Quênia, v.31, n. 1, pag 20-25, 2007.
- ORNDORFF, P.; HAMRICK, T.; SMOAK, I.; HAVELL, E. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v. 114; p. 1-15, 2006.
- OVERELL, J.R.; WILLISON, H.J. Recent developments in Miler Fisher syndrome and related disorders. *Current Opinion in Neurology*, v.18, p. 562-566, 2005.
- OVERFIELD, N. D. *Testing of eggs for quality*. London: Her Majesty's Stationary, 1974. 43 p.
- PARDI, H. S. *Influência da comercialização na qualidade de ovos de consumo*. 73f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1977.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Riscos microbiológicos da carne. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*, Goiânia: UFG, v.1, p.294-308, 1995.
- PARISI, A.; LANZILOTTA, S.G.; ADDANTE, N.; NORMANNO, G.; DI MODUGNO, G.; DAMBROSIO, A.; MONTAGNA, C.O. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in South-eastern Italy. *Veterinary Research Communications*, v.31, n.1, p.113–123, 2007.
- PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 177-188, 2002.
- PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.
- PENTEADO, F.R.; ESMERINO, L.A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. *UEPG Biol. Health Sci.*, Ponta Grossa, v.17, n.1, p. 37-45, 2011.
- PEPE, T.; DOMINICS, R.; ESPOSITO, G.; VENTRONE, I.; FRATAMICO, P.; CORTESI, M.L. Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy.

- Journal of Food Protection*, v.72, n.8, p.17718-1721, 2009.
- PERESI, J. T. M., LIMA, I.A.Z.C.; TAVECHIO, A.T; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de linhagens isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v.58, n.1, p.41-6, 1999.
- PEZZOTTI, G.; SERAFÍN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, p. 281-287, 2003.
- PILLAI, S.D., JESUDHASAN, P.R. Quorum sensing: how bacteria communicate. *Food Technology* v. 60, p. 42-50, 2006.
- PIRES, D.S.L.; PACHECO, M.S.; ROLIN, M.B.Q.; SANTANA, A.L.; MOURA, A.P.B.L. Pesquisa de *Salmonella* spp e coliformes termotolerantes em carcaças de frangos in natura comercializados no Distrito Sanitário V da Cidade do Recife – PE. *Medicina Veterinária*, Recife, v.3, n.1, p.31-36, 2009.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000(n° 44) to the Kauffman-White Scheme. *Research in Microbiology*, v. 152, n° 10, p. 907-909, 2001.
- RADKOWSKI, M. Short communication. Occurrence of *Salmonella* spp. in consumption eggs in Poland. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 64, p. 189-191, 2001.
- RANTHUM, M. A. *Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e de seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa-PR.* Disponível em: <teses.cicf.fiocruz.br/pdf/ranthummam.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2011.
- RAY, B. Introduction. In: Ray, B. (Ed.), *Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Food, Water and Feeds*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 1–8, 1989.
- REES, J.H.; SOUDAIN, S. E.; GREGSON, N. A.; HUGHES, R. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain–Barré syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 333; p. 1374-1379, 1995.
- RIBEIRO, S.A.M. *Infecção Experimental por Salmonella enterica subsp enterica sorovar Kottbus em pintos de corte de um dia e em ovos férteis* spf. 34p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, 2004.
- RIEDEL, G. *Controle sanitário dos alimentos*. 1 ed. São Paulo: Loyola, p. 31-34, 1987.
- ROCOURT, J.; BOERLIN, P.; GRIMONT, F.; JACQUET, C; PIFFARETTI, J.C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *International Journal of systematic bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 171-174, 1992.
- ROMANOFF, A. L.; ROMANOFF, A. J. . The avian egg. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, INC., 918 p, 1963.
- ROSENBERG, M.; KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in Microbiol Ecology*, v.9, p.353-393, 1986.
- RUMJANCK, N.G.; FONSECA, M.C.C; XAVIER, G.K. Quorum sensing em sistemas agrícolas. Comportamento multicelular em procariota via comunicação

- intercelular. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. n°33, p.35-50, 2004.
- SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. *Food Control*, v.18, n.9, p.1113-1120, 2007.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 308 p, 2002.
- SANTILIANO, F.C.; ALMEIDA, B.R.; IGNACCHITI, M.D.C.; PEREIRA JUNIOR, O.S. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. *PUBVET*, Londrina, v. 5, n. 3, Ed. 150, Art. 1009, 2011.
- SANTOS D.M.S.; BERCHIERI JÚNIOR A.; FERNANDES S.A.; TAVECHIO A.T.; AMARAL L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, p. 39-42 2000.
- SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRlich, G.D.; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, v.184, n.4, p.1140-1154, 2001.
- SHOENI, J.L.; DOYLE, M.P. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum colonizing bacteria producing anti-*Campylobacter jejuni* metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 664-670, 1992.
- SHIMIZU, K. S.; KAWANO, J. S. E.; NAKANO, C.; KITAGAWA, H.; FUGIO, K.; MATSUMURA, K.; YASUDA, R.; INAMOTO, T. prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 63 (3): 269-274, 2005.
- SHINTANI, H. Importance of considering injured microorganisms in sterilization validation. *Biocontrol. Sci.*, v. 11, p. 91–106, 2006.
- SILVA, E. N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. *Hig. Alimentar*, v.9, p.7-13, 1995.
- SILVA, A. M. S.; BORBA, H.; GIAMPIETRO, A.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, T. A.; SILVA, P. A. S. S.; A.M., BORBA, H., GIAMPIETRO, A.; BOIAGO, M. M.; SOUZA, T.A.; SOUZA, P.A. Embalagem à vácuo como alternativa para manutenção da qualidade o ovos armazenados em condições de ambiente. Disponível: <http://avisite.com.br/cet/img/20100706_vacu.pdf>. Acesso em 12 de março de 2013.
- SILVA, M. C. D.; RAMALHO, L.; FIGUEIREDO, E. T. *Salmonella* sp em ovos e carcaças de frango in natura comercializadas em Maceió, AL. *Higiene Alimentar.*, v. 18, p. 80-84, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela. 552 p., 2007.
- SIMÕES M.; MARQUES E.G.L.; ROCHA M.M.M.; PRANDI M.A.G.; PISANI B. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia; Foz do Iguaçu, Paraná. Brasil. p.413. 2001.
- SKANDAMIS, P.; YOON, N.; STOPFORTH, J.D.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, v. 25, p. 294 – 303, 2007.
- SON, I.; ENGLER, M.D.; BERRANG, M.E.; FEDORKA-CRAY, P.J.;

- HARRISON, M.A. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, n.1, p.16–22, 2007.
- STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. *Egg science and technology*. 3rd ed. Westport: Avi Pub. Co., 449p, 1986.
- STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D. *Microbiologia Ilustrada*. Editora Artmed. 531 pg. 2004.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. Forum: The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, v. 9, p. 1236-1243, 2007.
- TAKAHASHI, M.; KOGA, M.; YOKOYAMA, K.; YUKI, N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 1335-1339, 2005.
- TAUXE, R. V. *Salmonella*: A postmodern pathogen. *Journal of Food Protection*, v. 54(7), p. 563-568, 1991.
- TEIXEIRA, J.P. *Efeito das proteínas do soro de leite sobre a colonização de Escherichia coli O157: H7 na mucosa intestinal de camundongos balb/c.48f*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- THIAGARAJAN, D., SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. *Poultry Science*, v. 73, p. 89-98, 1994.
- TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A. da. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazônica*, v. 36(2), p. 205 – 208, 2006.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, p.83, 2000.
- TRESIERRA-AYALA, A., FERNADÉZ, H., BENDAYÁN, M.E., PEREYRA, G.,BERNUY, A. Aislamento de especies termotolerante de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. *Revista Saúde Pública*, v. 29; p.389-392, 1995.
- TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J. et al. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 63-69, 2003.
- UBABEF - União Brasileira de Avicultura. *Relatório Annual 2012*. Disponível em <http://www.abef.com.br/uba/uba_relatorios_anuais.php>. Acesso em 12 de janeiro de 2013.
- UHLICH, G.A.; COOKE, P.H.; SOLOMON, E.B. Analysis of the red-dry-rough phenotype of a *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2564-2572. 2006.
- UNIÃO EUROPÉIA. Comissão da Comunidade Européia. Regulamento (CE) n° 1237/2007 de 23 de Outubro de 2007. Altera o Regulamento CE n° 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho e da Decisão 2006/696/CE no que respeita à colocação no mercado de ovos provenientes de bando de galinhas poedeiras infectadas com *Salmonella* spp. Jornal Oficial da União Européia, Bruxelas, 23 outubro de 2007. Disponível em: <http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO_TECNICA/AVES_OVOS/Ovos_Ovoprodutos/Regulamento_1237-2007_23-10.pdf>. Acesso em 10 de Novembro de 2012

- UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) N° 2073/2005 DA COMISSÃO de 15 de Novembro de 2005. Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF>>. Acesso em 16 abril 2013.
- USDA. United States. Poultry Products Inspection Regulations. January, 2003. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Office of Public Health Science. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2001/ucm090633.htm>>. Acessado em 03 de dezembro de 2012.
- UYTTLENDAELE, M.; de TROY, P.; DEBEVERE, J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in Poultry Carcasses and Different Types of Poultry Products for Sale on the Belgian Retail Market. *Journal of Food Protection*, v. 62, n° 7, p. 735-740(6), 1999.
- VANDAMME, P. *Taxonomic of the family Campilobacteriaceae*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J., eds. *Campylobacter*. Washington: ASM Press, p.3-27, 2000.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. In. *COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS*. n. 3, 1996. Washington: American Public Health Association (APHA), 873 p, 1996.
- VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Foodborne pathogens: an illustrated text*. Londres, Wolfe, p.550, 1991.
- VELOSO, G. *Aves de capoeira. Apontamentos de Inspeção Sanitária II*. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2007.
- VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características da Carne de Frango. *Boletim Técnico - PIE-UFES*:01307 – p.7. Disponível em: <http://www.agais.com/telomc/b01307_caracteristicas_carnefrango.pdf>. Acessado em 05 de outubro de 2011.
- VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, Madison, v. 90, p. 349-356, 2004.
- VUGIA, D. J.; SAMUEL, M.; FARLEY, M. M.; MARCUS, R.; SHIFERAW, B.; SHALLOW, S.; SMITH, K.; ANGULO, F. J. Invasive *Salmonella* Infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: Incidence, Serotype Distribution, and Outcome. *Clinical of Infection Diseases*, n. 38, 2004.
- WU, V.C.H. A review of microbial injury and recovery methods inf food. *Food Microbiology*, v. 25, p. 735-744, 2008.
- YASHODA, K.P.; MODI, V.K.; MAHENDRAKAR, N.S.; SACHINDRA, N.M.; RAO, D. N. Quality characteristics of fried broiler chicken prepared by two processing methods. *Foodservice Research International*, v. 14, n° 3, p. 163–173, 2004.
- ZANCAN, F .T.; BERCHIERI JR, A.; FERNÁNDES, 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.

ANEXO I. Comportamento bioquímico de várias espécies de micro-organismos frente aos cartões para Vitek 2 e conteúdo dos mesmos

1) Resposta do *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* ATCC BAA – 1153 frente a diferentes testes bioquímicos no VITEK 2:

ArgA	-	PheA	V	GLYC	-	BGALi	-	MTE	-
GGT	V	ProA	-	dMNE	-	ODC	V	IGLM	V
LysA	-	PryA	+	dMAL	-	AARA	-	PHOS	-
dGAL	-	TyrA	-	SAC	-	PVATE	V	dRIB2	-
LeuA	+	APPA	-	NAG	-	PHC	-	OPS	V
ELLM	V	dGLU	-	URE	-	dMLT	V	dXYL	-

+: 95% a 100% positivo

V: 6% a 94% positivo

-: 0% a 5% positivo

2) Resposta do *Listeria monocytogenes* ATCC BAA-751 frente a diferentes testes bioquímicos:

AMY	+	CDEX	+	BGURr	-	URE	-	dMAL	+	PUL	-
PIPLC	V	AspA	V	AGAL	-	POLYB	+	BAC1	+	dRAF	-
dXYL	-	BGAR	-	PyrA	-	dGAL	-	NOVO	V	O129R	+
ADH1	-	AMAN	+	BGUR	-	dRIB	-	NC6.5	+	SAL	+
BGAL	-	PHOS	-	AlaA	V	ILATk	-	dMAN	-	SAC	-
AGLU	+	LeuA	V	TyrA	+	LAC	V	dMNE	+	dTRE	+
APPA	v	ProA	-	dSOR	-	NAG	+	MBdG	+	ADH2s	-
										OPTO	+

+: 95% a 100% positivo

V: 6% a 94% positivo

-: 0% a 5% positivo

3) Resposta do *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* ATCC 29213 frente a diferentes testes bioquímicos:

AMY	-	CDEX	-	BGURr	-	URE	-	dMAL	+	PUL	-
PIPLC	-	AspA	-	AGAL	-	POLYB	v	BACI	+	dRAF	-
dXYL	-	BGAR	-	PyrA	+	dGAL	v	NOVO	v	O129R	+
ADH1	+	AMAN	-	BGUR	-	dRIB	v	NC6.5	+	SAL	-
BGAL	v	PHOS	+	AlaA	-	ILATk	+	dMAN	+	SAC	+
AGLU	v	LeuA	v	TyrA	-	LAC	v	dMNE	+	dTRE	-
APPA	-	ProA	-	dSOR	-	NAG	v	MBdG	-	ADH2s	v
										OPTO	+

+: 95% a 100% positivo

V: 6% a 94% positivo

-: 0% a 5% positivo

4) Conteúdo das provas bioquímicas no cartão NH do VITEK 2:

Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade	Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade
1	Arginina ARILAMIDASE	ArgA	0,0324 mg	20	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
2	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg	22	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
3	L-Lisina ARILAMIDASE	LysA	0,0228 mg	28	SACAROSE//SUCROSE	SAC	0,3 mg
4	D-GALACTOSE	dGAL	0,3 mg	33	N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA	NAG	0,3 mg
5	Leucina ARILAMIDASE	LeuA	0,023 mg	36	UREASE	URE	0,15 mg
6	ELLMAN	ELLM	0,03 mg	39	BETA GALACTOPIRANOSIDAS E Indoxil	BGALi	0,006 mg
7	Fenilalanina ARILAMIDASE	PheA	0,026 mg	40	ORNITINA DESCAROXILASE	ODC	0,15 mg
8	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,023mg	41	ALFA-ARABINOSIDASE	AARA	0,0324 mg
10	L-Pirrolidonil ARILAMISASE	PyrA	0,018 mg	45	PIRUVATO	PVATE	0,15 mg
13	Tirosina ARIMILASE	TyrA	0,0279 mg	46	FOSFORIL COLINA	PHC	0,0366 mg
15	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,038 mg	47	D-MALATO	dMLT	0,15 mg
18	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg	51	MALTOTRIOSE	MTE	0,3 mg
19	GLICOGENIO	GLYG	0,18 mg	52	L-GLUTAMINA	IGLM	0,15 mg
				59	FOSFATASE	PHOS	0,05 mg

5) Conteúdo das provas bioquímicas no cartão GP do VITEK 2:

Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade	Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade
2	D-AMIGDALINA	AMY	0,1875 mg	32	RESISTÊNCIA A POLIMIXINA B	POLYB	0,00093 mg
4	FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C	PIPLC	0,015 mg	37	D-GALACTOSE	dGAL	0,3 mg
5	D-XILOSE	Dxyl	0,3mg	38	D-RIBOSE	dRIB	0,3 mg
8	ARGININA DIHIDROLASE 1	ADH1	0,111 mg	39	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg	42	LACTOSE	LAC	0,96 mg
11	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg	44	N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA	NAG	0,3 mg
13	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg	45	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
14	CICLODEXTRINA	CDEX	0,3 mg	46	RESISTÊNCIA A BACITRACINA	BACI	0,0006 mg
15	L-Aspartato ARILAMIDASE	AspA	0,024 mg	47	RESISTÊNCIA A NOVOBIOCINA	NOVO	0,000075 mg
16	BETA GALACTOPIRANOSIDAS E	BGAR	0,00204 mg	50	CRESCIMENTO EM NaCl 6,5%	NC6.5	1,68 mg
17	ALFA-MONOSIDASE	AMAN	0,036 mg	52	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
19	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg	53	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
20	Leucina ARILAMIDASE	LeuA	0,0234 mg	54	METIL-B-D-GLUCOPIRANOSIDA	MBdG	0,3 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg	56	PULULANO	PUL	0,3 mg
24	BETA-GLUCURONIDASE	BGURr	0,0018 mg	57	D-RAFINOSE	dRAF	0,3 mg
25	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg	58	RESISTÊNCIA O/129 (comp. vibrio.)	O129R	0,0084 mg
26	L-Pirrolidonil-ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg	59	SALICINA	SAL	0,3 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0,0378 mg	60	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
28	Alanina ARILAMIDASE	AlaA	0,0216 mg	62	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg	63	ARGININA DIHIDROLASE 2	ADH2s	0,27 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg	64	RESISTÊNCIA A OPTOQUINA	OPTO	0,000399 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg				

6) Conteúdo das provas bioquímicas no cartão GN do VITEK 2:

Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade	Poço	Teste	Mnmônica	Quantidade
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg	33	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg	34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3 mg
4	L-Pirolidonil-ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg	35	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg	36	CITRATO (SÓDIO)	CIT	0,054 mg
7	D-CELOBIOSE	dCEL	0,3 mg	37	MALONATO	MNT	0,15 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg	39	5-QUETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3 mg
10	PRODUÇÃO DE H ₂ S	H ₂ S	0,0024 mg	40	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408 mg	41	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324 mg	42	Alcalinização succinato	SUCT	0,15 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg	43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306 mg
14	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg	44	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg
15	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF	0,45 mg	45	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0,036 mg	46	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	GlyA	0,012 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg	47	ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC	0,3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg	48	LISINA DESCARBOXILASE	LDC	0,15 mg
20	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg	52	BASE DESCARBOXILASE	ODEC	NA
21	BETA-XILOSIDASE	BXYL	0,0324 mg	53	Assimilação L-HISTIDINA	IHISa	0,087 mg
22	BETA-Alanina arilamidase pNA	BAlap	0,0174 mg	56	CUMARATO	CMT	0,126 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg	57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0378 mg
26	LIPASE	LIP	0,0192 mg	58	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0105 mg
27	PALATINOSE	PLE	0,3 mg	59	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA	0,0576 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg	61	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,042 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg	62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg	64	Assimilação L-LACTATO	ILATa	0,186 mg

“Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele. Por isso, o universo de cada um se resume ao tamanho de seu saber.”

Albert Einstein

"Não se apegue tão violentamente a nada. Todo tolo mantém-se convicto; e todo convicto é um tolo; e quanto mais falho é o julgamento de um homem, maior é sua convicção".

Baltasar Gracian