

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária da UFMG  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Anna Paula Rezende Cintra

Avaliação da presença de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo e de suas toxinas em carnes de frango de corte processadas em sala com diferentes temperaturas ambientes

Belo Horizonte

2015

Anna Paula Rezende Cintra

**Avaliação da presença de Staphylococcus coagulase positivo e negativo e de suas toxinas em carnes de frango de corte processadas em sala com diferentes temperaturas ambientes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Prof. Marcelo Rezende de Souza

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvana de Vasconcelos Cançado

Belo Horizonte

2015

Cintra, Anna Paula Rezende, 1985-  
C575a Avaliação da presença de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo e de suas toxinas em carnes de frango de corte processadas em sala com diferentes temperaturas ambientes / Anna Paula Rezende Cintra. – 2014.  
67 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

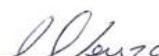
Co-orientador: Silvana de Vasconcelos Caçado

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

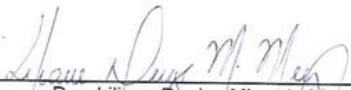
1. Carne de frango – Análise – Teses.
2. Carne de frango – Qualidade – Teses.
3. Carne de frango – Microbiologia – Teses.
4. Alimentos – Contaminação – Teses.
5. Estafilococos – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de. II. Caçado, Silvana de Vasconcelos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 664.9

Dissertação defendida e aprovada em 27 de março de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marcelo Resende de Souza  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Tadeu Chavés de Figueiredo  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Liliâne Denize Miranda Menezes  
Instituto Mineiro de Agropecuária

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Silvana de Vasconcelos Cançado  
Escola de Veterinária - UFMG

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me levar no colo todas as vezes que não consegui caminhar e por me proporcionar paz e vida nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Simone e Antônio Carlos, por me darem a vida, bons princípios, educação e oportunidades. Obrigada mãe, por me ensinar o valor do estudo e pai, por me mostrar o valor do trabalho.

Aos meus irmãos, Lívia, Rodrigo e Giuliano, por fazerem da minha vida mais completa e repleta de ensinamentos, sem vocês não saberia o verdadeiro significado do amor fraterno.

A todos os meus familiares, que durante esse tempo estiveram ao meu lado, pelo apoio e incentivo.

À Professora Silvana Caçado, pela orientação, apoio, incentivo e paciência com a minha inexperiência e pouca maturidade muitas vezes. Obrigada por persistir. Você é exemplo de profissional, mulher e mãe.

Ao Professor Marcelo Resende, por ter tanta disponibilidade e paciência em todas as horas que necessitei de ajuda.

Ao Professor Andrey Pereira Lage, por me deixar ser um pouco intrometida e me acolher com tanto carinho e profissionalismo desde a graduação, você é um exemplo de pessoa e firmeza.

Ao Professor Valentim Arabicano Gheller, serei eternamente grata, por ter me dado a oportunidade de mostrar meu valor na veterinária, aprendi demais e com certeza sou muito melhor por ter convivido com você.

Ao Professor Wagner Luiz Moreira dos Santos, meu primeiro contato com os produtos de origem animal.

Ao pessoal do Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), em especial Liliane Menezes, pelo apoio fundamental, paciência, dedicação e interesse.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, especialmente Professor Tadeu pelas orientações, atenção e ajuda fundamental nos gráficos de estatística.

À todos os amigos da veterinária, em especial Luciana Pimenta, sem vocês não teria conseguido nada e seria tudo muito mais difícil.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFMG, ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

*Quem Procura ter sabedoria ama a sua vida, e quem age  
com inteligência encontra a felicidade.*

**Provérbios 19:8**

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Legislações aplicadas ao abate e a produção de carne de frangos	19
2.2. Programas de Controle em indústrias de frango	20
2.3. Legislações trabalhistas na indústria de abate	23
2.4. Contaminação microbiológica de ambientes e da carne de frango	24
2.4.1. Contaminação ambiental - Micro-organismos mesófilos aeróbios	26
2.5. O gênero <i>Staphylococcus</i>	27
2.5.1. <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (SCP)	29
2.5.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	31
2.5.3. Fatores de virulência	34
2.5.4. Enterotoxinas	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Abatedouro	40
3.2. Amostras	40
3.3. Tratamentos	41
3.4. Variáveis analisadas	43
3.4.1. Contaminação ambiental na sala de cortes/desossa	43
3.4.2. Isolamento e enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e coagulase negativo	43
3.4.3. Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C <sup>1</sup> , C <sup>2</sup> , C <sup>3</sup> , D e E)	45
3.5. Delineamento Experimental	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Contaminação das carcaças após o gotejamento	47
4.2. Contaminação Ambiental	49
4.3. Temperatura das amostras de peito de frangos de corte	50

4.4. Contaminação por SCP e SCN	52
4.5. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C <sup>1</sup> , C <sup>2</sup> , C <sup>3</sup> , D e E)	54
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APPCC</b>	Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
<b>Aw</b>	Atividade de água
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>CE</b>	Comunidade Européia
<b>CEASA</b>	Central de Abastecimento de Minas Gerais
<b>CLT</b>	Consolidação das Leis do Trabalho
<b>DIPOA</b>	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTA</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>ELFA</b>	<i>Enzyme Linked Immunofluorescent Assay</i>
<b>EPI's</b>	Equipamentos de Proteção Individual
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAO</b>	Organizações das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IMA</b>	Instituto Mineiro de Agropecuária
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LSMA</b>	Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MERCOSUL</b>	Mercado Comum do Sul
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MTE</b>	Ministério do Trabalho e Emprego
<b>OMC</b>	Organização Mundial do Comércio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCC</b>	Pontos Críticos de Controle
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogênio
<b>POP</b>	Procedimentos Operacionais Padronizados
<b>PPHO</b>	Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional

---

---

<b>RFV</b>	<i>Relative Fluorescence Value</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo
<b>SDA</b>	Secretaria de Defesa Agropecuária
<b>SE</b>	Enterotoxinas Estafilocócicas
<b>SEA</b>	Enterotoxina A
<b>SEB</b>	Enterotoxina B
<b>SEC<sup>1</sup></b>	Enterotoxina C <sup>1</sup>
<b>SEC<sup>2</sup></b>	Enterotoxina C <sup>2</sup>
<b>SEC<sup>3</sup></b>	Enterotoxina C <sup>3</sup>
<b>SED</b>	Enterotoxina D
<b>SEE</b>	Enterotoxina E
<b>SEG</b>	Enterotoxina G
<b>SEH</b>	Enterotoxina H
<b>SEI</b>	Enterotoxina I
<b>SEL</b>	Tipo-enterotoxina
<b>SELJ</b>	Tipo-enterotoxina J
<b>SELK</b>	Tipo-enterotoxina K
<b>SELL</b>	Tipo-enterotoxina L
<b>SELM</b>	Tipo-enterotoxina M
<b>SELN</b>	Tipo-enterotoxina N
<b>SELO</b>	Tipo-enterotoxina O
<b>SELP</b>	Tipo-enterotoxina P
<b>SELQ</b>	Tipo-enterotoxina Q
<b>SELR</b>	Tipo-enterotoxina R
<b>SELT</b>	Tipo-enterotoxina T
<b>SELU</b>	Tipo-enterotoxina U
<b>SES</b>	Enterotoxina S
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Principais espécies de SCP, hospedeiros e patogenicidade	30
Tabela 2. Principais espécies de SCN, hospedeiros e patogenicidade	32
Tabela 3. Médias das temperaturas (°C) e desvios-padrão mensuradas na sala de cortes e desossa nos diferentes tratamentos	42
Tabela 4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC g <sup>-1</sup> ) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (UFC g <sup>-1</sup> ) em carcaças de frangos de corte	47
Tabela 5. Temperatura média das carcaças inteiras após o gotejamento	48
Tabela 6. Resultados das análises de contaminação ambiental da sala de cortes submetida a diferentes temperaturas ambientais	49
Tabela 7. Temperaturas médias das amostras de peitos de frangos de corte coletadas em salas de cortes submetidas às temperaturas ambiente	51
Tabela 8. Contagem médias de SCP (UFC g <sup>-1</sup> ) e SCN (UFC g <sup>-1</sup> ) nas amostras de peitos de frango coletadas na sala de cortes submetida a diferentes temperaturas ambiente	52
Tabela 9. Equação de regressão da contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo da sala de cortes em função das diferentes temperaturas ambientes utilizadas	53

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Carcaça após o chiller	41
Figura 2. Peito na sala de cortes	41
Figura 3. Sala de cortes/desossa	42
Figura 4. Retirada de 25g do pool para análise	45
Figura 5. Placa de Petri com colônias	45
Figura 6. Gráfico de regressão linear dos valores de contaminação ambiental em função das diferentes temperaturas ambientais utilizadas	49
Figura 7. Gráfico de regressão dos valores de contaminação ambiental em função das diferentes tratamentos	53

---

## RESUMO

O controle da temperatura do ambiente de processamento é um dos principais fatores relacionados a produção de alimentos seguros e com qualidade microbiológica. Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura ambiente durante o corte e a desossa da carne de frangos sobre a qualidade microbiológica dos produtos finais foram coletadas 288 amostras de carne de peito de frango sem pele, obtidas em uma sala de cortes climatizada submetida a quatro diferentes temperaturas ambientes (12°C, 14°C, 16°C e 18°C). Para avaliação da contaminação ambiental foi realizada a contagem de microorganismos mesófilos aeróbios e para a avaliação da qualidade microbiológica da carne foram realizadas a contagem de *Staphylococcus* spp. e a pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas. Os resultados encontrados demonstraram um aumento da contaminação ambiental ( $P=0,01$ ) à medida que a temperatura da sala foi aumentada. Porém, nos cortes cárneos, não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) na contagem de *Staphylococcus* spp. também não foi detectada a presença de enterotoxinas estafilocócicas nas amostras analisadas. Foi concluído que, apesar da elevação da contaminação ambiental, o aumento da temperatura ambiente da sala de cortes não comprometeu a qualidade microbiológica do produto final.

Palavras - chaves: *Staphylococcus* spp., enterotoxinas estafilocócicas, contaminação ambiental, temperatura ambiente, carne de peito de frango.

## ABSTRACT

The control of temperature in the processing room is one of major factor associated with the production of safe food with a satisfactory microbiological quality. A total of 288 samples of skinless chicken breast meat were placed in a cutting room, subjected to four different temperatures (12°C, 14°C, 16°C and 18°C) and collected with to evaluate the influence of the room temperature on the microbiological quality during the cutting and boning of chicken breasts. Aerobic mesophilic microorganisms were counted to evaluate the environmental contamination. In addition, the *Staphylococcus* spp. were counted, and an analysis for the presence of staphylococcal enterotoxins was performed to determine the microbiological quality of the meat. The results showed an increase in environmental contamination ( $P=0.01$ ) with an increase in room temperature. However, no significant differences ( $P>0.05$ ) were observed in the meat cuts regarding the count of *Staphylococcus* spp. Moreover, no staphylococcal enterotoxins were detected in the samples analyzed. Thus, despite increasing the environmental contamination, the increase in the cutting room temperature did not affect the microbiological quality of the final product.

Keywords: *Staphylococcus* spp., environmental contamination, chicken breast meat, cutting room temperature.

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem adquirido cada vez mais espaço no cenário mundial e se destacado, colocando o Brasil entre os grandes produtores e exportadores nos últimos anos. A produção de carne de frango atingiu 12,3 milhões de toneladas em 2012, o que manteve o país como terceiro maior produtor de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos (17,5 milhões de toneladas) e da China (13,7 milhões de toneladas). Do volume total de frangos produzido, 69% foram destinados ao consumo interno e 31% para exportações, sendo que este volume exportado colocou o país na posição de maior exportador mundial de carne de aves (UBABEF, 2013).

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida mundialmente, porém, o frango tem demonstrado grande potencial para atingir o topo do consumo de carnes dentro de alguns anos. O consumo per capita mundial de carne de frango tem apresentado rápido crescimento e, segundo estimativas, deverá ultrapassar o consumo de carne suína antes de 2020. No Brasil, a carne de frango já é a fonte de proteína mais consumida, seguida pela carne bovina e em terceiro lugar pela carne suína. O consumo de frango no país passou dos 11,8 kg per capita em 1988 para 45 kg em 2012, representando um aumento de 280% nos últimos 24 anos (National Chicken Council, 2013; UBABEF, 2013).

A expressividade internacional do Brasil como exportador de alimentos de origem animal, assim como as crescentes exigências do próprio mercado interno, faz com que a cadeia produtiva se preocupe com a produção de alimentos seguros e de qualidade. A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e de minerais. E devido suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade é um ótimo meio para desenvolvimento de micro-organismos. Portanto, cuidados durante seu processamento como o controle da higiene e a implantação de programas de segurança alimentar devem ser aplicados em toda a cadeia produtiva, desde sua origem até a chegada à casa do consumidor (Lopes *et al.*, 2007).

Desta maneira, a avaliação microbiológica constitui um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos, assim como para verificar se padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidos adequadamente. As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são divulgadas há muitos anos e atualmente, são conhecidos cerca de 250 agentes biológicos causadores dessas doenças. Elas podem ser causadas por ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Normalmente essas doenças levam ao quadro de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia e, dependendo do agente etiológico, quadros mais severos podem ocorrer. Como causadores de DTA, já foram identificados as bactérias *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e vibrios; os parasitas *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia* e *Toxoplasma gondii*; e os vírus Rotavírus, Adenovírus, Calicivírus, Astrovírus, Coronavírus, Norwalk e tipo Norwalk (CVE/SES, 2002).

A carne de frango é um dos alimentos mais envolvidos em surtos de DTA. Desta forma, torna-se necessário uma melhor avaliação dos micro-organismos presentes nas carcaças disponibilizadas para consumo. A intoxicação estafilocócica é a DTA com segunda maior incidência no Brasil, ficando atrás somente da infecção causada pelo gênero *Salmonella* spp. No mundo esta doença ocupa o terceiro lugar, sendo que em primeiro lugar encontra-se a campilobacteriose, causada por bactérias do gênero *Campylobacter* e em segundo a salmonelose. A intoxicação por *Staphylococcus* spp. é resultante da ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas (SE) termoestáveis, pré-formadas, produzidas principalmente por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo o *Staphylococcus aureus* a espécie mais isolada em casos de surtos. Existem também relatos de *Staphylococcus* coagulase negativo produtores de enterotoxinas. No Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, este grupo bacteriano foi responsável por 799 casos de gastroenterites, contudo este número pode ser maior, pois em outros 4.148 surtos no mesmo período não foram identificados os agentes etiológicos envolvidos (Freitas *et al.*, 2004; Hennekinne *et al.*, 2007; Ombui e Mathenge, 2007; SVS, 2011).

Dentro da indústria de abate e processamento de frangos de corte, existem várias normas que devem ser seguidas, a fim de minimizar a contaminação microbiológica da carcaça. Dentre elas, o monitoramento e manutenção das temperaturas específicas de cada sala de processamento são de fundamental importância. A sala onde os cortes são produzidos é um desses ambientes o qual deve ser monitorado, mantendo a temperatura ambiente a 12°C, de acordo com a legislação brasileira. Porém, o trabalho constante sob essa temperatura, pode ser considerado uma condição de risco aos empregados, o que pode levar a empresa ao pagamento de adicional por insalubridade (Brasil, 1998).

Existe a necessidade de estudos acerca da influência da temperatura ambiente na presença e multiplicação de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em carcaças de frango, bem como a produção de SE, principalmente em produtos crus. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e enumerar *Staphylococcus* spp. e verificar a presença de enterotoxinas produzidas por estes micro-organismos em peitos de frango de corte produzidos em sala de processamento sob diferentes temperaturas ambiente.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Legislações aplicadas ao abate e a produção de carne de frangos**

No dia 10 de novembro de 1998 foi publicada a Portaria nº 210, que aprovou o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária da Carne de Aves. Ela dispõe sobre as definições e parâmetros produtivos relacionados ao processo de abate de aves como: equipamentos, instalações, higienização, temperaturas, rotulagem, embalagem entre outros. A legislação preconiza que os estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem possuir dependência própria, exclusiva e climatizada, com temperatura ambiente não superior a 12°C. Ainda segundo esta mesma Portaria, a seção destinada a cortes e/ou desossa de carcaças deve dispor de equipamento de mensuração para controle e registro da temperatura ambiente. O princípio para a

utilização de baixas temperaturas é o retardamento da atividade microbiana, pois a temperatura e a umidade do ar e da superfície da carne podem favorecer o crescimento de micro-organismos deteriorantes e também patogênicos. Por isso é importante que se mantenha a temperatura na sala de cortes de maneira que esta não afete a qualidade do produto final (Brasil, 1998; Borges, 2002).

Paralelamente à publicação da Portaria nº 210 pelo MAPA, o Ministério da Saúde (MS) através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em 2001, a Resolução nº 12 que instituiu o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, incluindo carnes resfriadas ou congeladas de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou em cortes) (RDC nº12/2001). A RDC estabelece para carne de aves apenas o limite máximo permitido para coliformes termotolerantes de  $1,0 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC g<sup>-1</sup>). A contagem de *Staphylococcus* é exigida somente em produtos cárneos e carnes embaladas a vácuo, e o padrão permitido é a contagem máxima de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>, no entanto, a legislação se reporta apenas a *Staphylococcus* coagulase positivo, sem a identificação da espécie (Brasil, 2001).

## **2.2. Programas de Controle em indústrias de frango**

A Inspeção de Produtos de Origem Animal é de competência do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), subordinado à Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA. As ações de inspeção são desenvolvidas em todo o Brasil com respaldo na legislação que regula as atividades a ela relacionadas. A coordenação em âmbito nacional, da aplicação das leis, normas regulamentadas e critérios para a garantia da qualidade e segurança dos produtos de origem animal, são de responsabilidade do DIPOA (Brasil, 1997).

O DIPOA utiliza um modelo de inspeção sanitária baseado no controle de processos. Esse procedimento fundamenta-se na inspeção contínua e sistemática de todos os

fatores que podem interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos expostos ao consumo para a população. De forma complementar as atividades rotineiras de inspeção e acompanhando os avanços das legislações no tocante às responsabilidades dos fabricantes, este departamento do MAPA, inseriu em sua rotina de tarefas, a avaliação da implantação e da execução, por parte da indústria inspecionada, dos chamados Programas de Autocontrole. As modernas legislações dirigidas ao controle sanitário de alimentos tratam esses programas como requisitos básicos para a garantia da inocuidade dos produtos. Eles incluem o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e, num contexto mais amplo, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e são desenvolvidos, implantados, mantidos e monitorados pelos estabelecimentos, visando assegurar a qualidade higiênico-sanitária de seus produtos. Além disso, são obrigatórios em todas as indústrias inspecionadas pelo MAPA (Brasil, 1993; Brasil, 1997; Brasil, 2002; Brasil, 2003; Brasil, 2005).

De acordo com a Portaria nº 1428 do MS, o programa de BPF é um conjunto de normas adotadas a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos produzidos com os regulamentos técnicos. Para seguir este programa de controle, as indústrias devem escrever o manual de boas práticas, um documento que descreve as operações realizadas pelo estabelecimento, incluindo, no mínimo, os requisitos higiênico-sanitários dos edifícios, a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controle da água de abastecimento, o controle integrado de vetores e pragas urbanas, a capacitação profissional, o controle da higiene e saúde dos manipuladores, o manejo de resíduos e o controle e garantia de qualidade do alimento preparado (Brasil, 1993).

A Portaria nº 368, do MAPA, aborda especificamente as BPF aprovando o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas para estabelecimentos industrializadores de alimentos, onde são estabelecidos os requisitos essenciais de higiene para alimentos destinados ao consumo humano. A Portaria nº 326 de 1997 da ANVISA exige, para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos, o

manual de BPF e sugere para a padronização e montagem do manual a implantação na indústria dos PPHO (Brasil, 1997).

Já os PPHO são representados por requisitos de BPF considerados críticos na cadeia produtiva de alimentos. Para estes procedimentos, recomenda-se a adoção de programas de monitorização, registros, ações corretivas e aplicação constante de *check-lists*. Os PPHO preconizados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) constituíam a referência para o controle de procedimentos de higiene, até que em 2002, a RDC nº 275 da ANVISA criou e instituiu no Brasil os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) que vão um pouco além do controle da higiene, porém não descaracterizam os PPHO, que continuam sendo recomendados pelo MAPA. Os POP contemplam alguns itens do manual de boas práticas, sendo um pouco mais abrangente que os PPHO (Brasil, 1997; Brasil, 1998; Brasil, 2002).

O APPCC, regulamentado através da Portaria nº46 de 1998, é considerado uma ferramenta que identifica e controla perigos químicos, físicos e microbiológicos que possam colocar a saúde do consumidor em risco e se aplica a todas as linhas de produção. Tem como pré-requisitos as BPF e os PPHO. Este programa identifica os perigos potenciais à segurança do alimento desde a obtenção das matérias-primas até o consumo em determinadas etapas do processamento, sendo estes denominados Pontos Críticos de Controle (PCC). Nestes PCC devem ser tomadas medidas de controle e monitorização que garantam, ao final do processo, a obtenção de um alimento seguro e com qualidade. O Sistema é recomendado por organismos internacionais como a Organização Mundial do Comércio (OMC), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), e é exigido pela Comunidade Européia (CE) e pelos Estados Unidos (EUA) (Brasil, 1998).

O Sistema APPCC contribui para uma maior satisfação do consumidor, torna as empresas mais competitivas, amplia as possibilidades de conquista de novos mercados, nacionais e internacionais, além de propiciar a redução de perdas de matérias-primas, embalagens e produto (Brasil, 1998).

### **2.3. Legislações trabalhistas na indústria de abate**

O ser humano, assim como os animais são significativamente influenciados pelas condições ambientais e a temperatura ambiente é um ponto que deve merecer atenção especial, quando se busca criar boas condições para o trabalho. A exposição ocupacional a baixas temperaturas leva o organismo humano a algumas adaptações fisiológicas que interferem diretamente no seu desempenho. A sensação térmica, o tremor durante a jornada de trabalho, a falta de força e de agilidade e a dormência nas mãos, a gripe, outras doenças respiratórias (faringite, laringite, sinusite, bronquite), as doenças músculo-esqueléticas e as lesões nas mãos constituem os fatores mais frequentemente encontrados em trabalhadores expostos a baixas temperaturas (Buzanello, 2003; Araújo *et al.*, 2012).

No Brasil, existem leis trabalhistas que dispõem de mecanismos para preservar o trabalhador e seus direitos. A Portaria nº3.214 do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) prevê adicional de insalubridade, a trabalhadores que se exponham ao frio artificial em operações no interior de câmara frigorífica ou locais com condições similares (Brasil, 1978). O frio artificial é considerado quando os trabalhadores são submetidos a temperaturas inferiores a 10°C, 12°C ou 15°C e esta variação é dependente da região climática do país em que a indústria se encontra (Brasil, 1943).

A Portaria nº21 define que as regiões climáticas de 10°C, 12°C ou 15°C se encontram no mapa Brasil Climats do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). De acordo com esta portaria, as zonas climáticas brasileiras são definidas de acordo com a temperatura média anual, a média anual de meses secos e o tipo de vegetação natural. Assim a primeira, segunda e terceira zonas climáticas do mapa oficial são consideradas zonas climáticas quentes, a quarta zona é considerada zona climática subquente, e a quinta, sexta e sétima zonas como mesotérmicas (branda ou mediana). O frio artificial, que é a sensação térmica produzida pela falta de calor causada por meios artificiais através de refrigeração, é definido como aquele onde a temperatura do ambiente seja

igual ou inferior a 10°C para quinta, sexta e sétima zona climática do mapa oficial, 12°C para a quarta zona climática e 15°C para a primeira, segunda e terceira zonas climáticas (Brasil, 1994).

De acordo com o art. 253 da Consolidação das Leis do Trabalho (CLT), a eliminação do agente insalubre “frio” está condicionada à existência concomitante de dois elementos, o uso satisfatório de Equipamentos de Proteção Individual (EPI’s) e a concessão efetiva de intervalos de 20 minutos a cada hora e 40 minutos de trabalho. A necessidade de ambos os requisitos decorre do fato de o uso de EPI’s reduzir apenas a consequência maléfica do frio sobre a pele do trabalhador e a concessão dos intervalos impede a inalação e exposição ao ar frio de forma constante, evitando assim, a redução da temperatura corporal a níveis que comprometem a higidez do trabalhador (Brasil, 1978).

#### **2.4. Contaminação microbiológica de ambientes e da carne de frango**

A avaliação microbiológica de produtos alimentícios objetiva quantificar o grau de contaminação por micro-organismos deteriorantes e a presença de agentes patogênicos, dando informações importantes quanto às condições higiênicas e sanitárias de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e risco à saúde da população (Bolton *et al.*, 2014)

Os principais micro-organismos contaminantes encontrados em carcaças de aves são bactérias mesófilas (como bactérias do grupo dos coliformes, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., entre outras) e psicrotróficas (gêneros *Pseudomonas* e *Moraxella/Acinetobacter* e espécies como *Aeromonas* sp., *Shewanella putrefacins*, *Lactobacillus* sp. e *Brochorix thermosphacta*). As bactérias caracterizadas como mesofílicas são aquelas que crescem a temperaturas de 20°C a 45°C. A presença de micro-organismos mesofílicos, grupo em que se encontram as principais bactérias patogênicas, no alimento indicam higiene e desinfecção inadequadas, matéria-prima contaminada e condições de tempo e temperatura deficientes durante o processamento e

armazenagem dos alimentos. Os micro-organismos psicrotróficos são caracterizados por ter sua temperatura ótima de crescimento entre 20°C a 30°C, sendo capazes de se multiplicar a temperaturas de 0 a 7°C. Estes estão diretamente relacionados à qualidade sensorial do produto e causam a deterioração precoce de alimentos refrigerados (Jay, 2002; Hinton Jr *et al.*, 2004; Rodrigues, *et al.* 2008; FDA, 2010; Penteado, 2010; Kozacisnski *et al.*, 2012).

A contaminação por micro-organismos deteriorantes e até mesmo por alguns patogênicos é inevitável, pois normalmente as aves possuem em suas peles e penas grandes quantidades de bactérias. Estas bactérias durante o processo de obtenção da carne poderão contaminar as carcaças, o ambiente e até mesmo os manipuladores (Hinton Jr *et al.*, 2004).

As bactérias que contaminam a carne de frango são provenientes não só da microbiota inicial da pele e penas dos animais, os manipuladores podem também ser responsáveis por transferir micro-organismos aos alimentos, de forma direta ou indireta. A transmissão direta se dá pela contaminação do alimento por bactérias presentes na superfície corporal do trabalhador ou em secreções produzidas pelo mesmo, sendo que a microbiota das mãos e do vestuário externo normalmente refletem os hábitos individuais do manipulador de alimentos. Já a forma indireta acontece quando vetores como moscas, baratas e ratos entram em contato com material humano (fezes, urina e escarro), carreando micro-organismos através de suas patas para o alimento, ou mesmo depositando nos equipamentos, utensílios, pisos, paredes e tetos de abatedouros avícolas que, por sua vez, tornam-se contaminados. Fontes importantes de contaminação são a cavidades nasal, a boca, a pele, e o trato gastrintestinal do homem, os quais podem ser fonte de micro-organismos devido à práticas higiênicas precárias (Jay, 2005; Silva Jr, 2007).

A contaminação da carne de frango pode ocorrer também por bactérias presentes no ar, superfícies de equipamentos de trabalho, equipamentos, utensílios, recipientes, etc. O ar representa um fator importante na contaminação, pois através dele são disseminados

aerossóis e partículas contendo micro-organismos patogênicos em seu interior que ao entrarem em contato com os alimentos os contamina (Jay, 2005).

#### 2.4.1. Contaminação ambiental - Micro-organismos mesófilos aeróbios

Micro-organismos mesófilos aeróbios são bactérias que necessitam de oxigênio para sobreviver e que crescem em temperaturas entre 10°C a 45°C, sendo sua temperatura ótima em torno de 30°C e 40°C. As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por espécies de *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus*. Alguns micro-organismos deste grupo são utilizados para a verificação da qualidade do alimento e do ambiente em que estes alimentos são produzidos, eles são chamados de micro-organismos indicadores e tem grande importância no controle da qualidade. A contagem total de aeróbios mesófilos em placas é um dos métodos mais utilizados como indicador geral de qualidade higiênico-sanitária dos ambientes e, é um parâmetro de importância, pois além de indicar a qualidade sanitária, pode também indicar se há a possibilidade de crescimento de patógenos, já que a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesofílicas. Sendo assim, é essencial o controle das condições higiênico-sanitárias nos locais onde os alimentos são manipulados, e a avaliação da contaminação microbiológica do ar em locais de risco é considerada uma importante ação de prevenção (Riedel, 1987; Jay, 2005; Franco e Landgraf, 2008; Brandão, 2011).

Para avaliação da contaminação ambiental do abatedouro é preconizada a contagem padrão em placas de micro-organismos aeróbios ou facultativos mesófilos a 32°C-35°C, durante 48h e psicotróficos a 7°C, durante 10 dias e ainda, a contagem padrão de bolores e leveduras com incubação a 20°C-25°C durante 3-5 dias (Silva Jr, 2007).

Haas *et al.* (2005) investigaram a concentração e composição de micro-organismos na área de pendura e na seção de separação da vesícula biliar em um abatedouro de aves na Áustria. A concentração média de bactérias mesofílicas na pendura foi de  $1,1 \times 10^6$

UFC/m<sup>3</sup>. Já na seção de separação da vesícula biliar, a concentração média encontrada foi de  $4,7 \times 10^6$  UFC/m<sup>3</sup>. Estes valores são considerados altos, porém esperados na área suja do abatedouro.

## 2.5. O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* (do grego *staphyle* – cacho de uvas) foi primariamente estudado por Alexander Ogston (1844-1929) que verificou a presença de dois tipos distintos de micrococcos (do grego *Kokkos* – grão), sendo que um deles já havia sido identificado por Billroth em 1874, recebendo o nome de *Streptococcus* (arranjo em cadeia), o outro coco identificado, foi nomeado pelo próprio Ogston como *Staphylococcus* (arranjo em grupos). Posteriormente em 1884, Rosenbach (1842-1923) isolou duas linhagens de *Staphylococcus*, as quais foram nomeadas de acordo com a coloração de suas colônias: *Staphylococcus aureus* (do latim *aurum* – ouro) e *Staphylococcus albus* (do latim *albus* – branco), atualmente denominado *S. epidermidis*. Além disto, o autor foi o primeiro a descrever detalhadamente o gênero *Staphylococcus* (Ogston 1981; Ogston 1982; Rosenbach, 1884).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem ao Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem *Bacillales* e Família *Staphylococcaceae* e são cocos esféricos, medindo de 0.5–1.5 µm de diâmetro, não esporulados, imóveis, Gram positivo, catalase positivo e apresentam conteúdo de DNA G + C de 33–40 mol %. Possuem diversos arranjos: isolados, em pares, tétrades, cadeias curtas (três ou quatro células) e cacho de uva, sendo este último o mais comum. Geralmente não possuem cápsula ou são limitados quanto à sua formação. A maioria das espécies são anaeróbias facultativas, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*, os quais apresentam crescimento mais rápido e abundante em condições aeróbias. Estes *Staphylococcus* excepcionais também são catalase negativo (Rosenbach, 1884).

Dentre os fatores que podem afetar o crescimento estafilocócico estão: o nível de contaminação, temperatura de conservação, atividade de água ( $A_w$ ), concentração de cloreto de sódio, outros sais e antibióticos, antioxidantes, acidez, atmosfera de conservação, embalagem, microbiota competitiva e o tipo de enterotoxina produzida. Temperaturas superiores a 45°C ou inferiores a 5°C,  $A_w < 0,90$ , 3 a 20% de NaCl, pH acima de 9,0 e abaixo de 5,0 podem controlar ou limitar o crescimento do micro-organismo e a produção de toxina estafilocócica (Oliveira *et al.*, 1995).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 47 espécies e 24 subespécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Estes micro-organismos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo classificados como ubíquos, também fazem parte da microbiota autóctone da pele e mucosas do homem e de animais, além de serem encontrados também em outros sítios anatômicos. A partir dessas localizações, o micro-organismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente. Existem cinco espécies a serem consideradas como potenciais patógenos humanos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*, entretanto os três primeiros são os mais isolados (Klood *et al.*, 1991; Koneman *et al.*, 2001; Jay, 2005; Götz *et al.*, 2006; Hennekinne *et al.*, 2010; Euzéby, 2012).

Os micro-organismos *Staphylococcus* estão divididos em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN). Os SCP são capazes de produzir uma enzima chamada coagulase, que é responsável pela conversão do fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina. SCN são todas aquelas espécies que não produzem a enzima coagulase (Madigan *et al.*, 2004; Bannerman *et al.*, 2007).

Menezes (2013), com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de carcaças de frangos de corte, avaliou 240 amostras de carcaças coletadas em vários abatedouros do Estado de Minas Gerais, e encontrou 100% de amostras positivas para *Staphylococcus* spp. Destas amostras positivas, 69% apresentaram valores acima de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. O autor observou que estes altos índices de *Staphylococcus* spp. são uma fonte de preocupação, uma vez que a sua presença indica falhas no processo de produção e oferece chances de desenvolvimento destes micro-organismos durante a manipulação e

preparo do produto. Observou ainda que considerando o potencial enterotoxigênico de algumas linhagens de *Staphylococcus*, o risco aumenta ainda mais.

#### 2.5.1. *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP)

As principais espécies pertencentes ao grupo SCP estão listadas na Tab. 1. Os membros deste grupo apresentam uma grande capacidade em contornar as condições adversas encontradas na corrente sanguínea do hospedeiro, como a escassa oferta de certos nutrientes, os ataques do sistema imunológico ou medidas utilizadas para combater a infecção a nível clínico. O *Staphylococcus aureus* é a espécie mais versátil tanto do grupo quanto do gênero. Sua composição conta com um enorme aparato de diferentes fatores de virulência e apoio de produtos de genes adicionais que aumentam a capacidade de sobreviver dentro do hospedeiro vivo e fazem com que *S. aureus* seja considerado um dos patógenos mais virulentos encontrados em carne de frango (Türkyilmaz e Kaya, 2006).

A contagem elevada de SCP nos alimentos deve ser avaliada com cautela, uma vez que somente este dado não pode incriminar um produto como vetor de intoxicação alimentar. As chances de multiplicação dos SCP podem ser limitadas em carnes cruas pelo crescimento competitivo com outros micro-organismos mesofílicos. Porém, a alta incidência destes micro-organismos nestes produtos, indica problemas de contaminação cruzada tanto na obtenção, quanto na preparação destes alimentos (Davies e Board, 1998; Miliotis e Bier, 2003).

Os *Staphylococcus aureus* são micro-organismos anaeróbios facultativos e apresentam temperaturas de crescimento de 7°C a 45°C, sendo a faixa ótima entre 30 – 37°C (Fernandes, 2009).

Penteado e Esmerino (2011), com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias de cortes de frango resfriados comercializados em cinco pontos de venda no município de Ponta Grossa – PR, analisaram 50 amostras de 10 lotes distintos no período de março a maio de 2008, para a contagem de *Staphylococcus aureus*. Os autores detectaram a

presença desse micro-organismo em 40% das amostras analisadas, com contagens variando entre 11 e 47 UFC g<sup>-1</sup>, valores considerados baixos.

**Tabela 1.** Principais espécies de SCP, hospedeiros e patogenicidade

<b>Espécie</b>	<b>Principais Hospedeiros</b>	<b>Patogenicidade</b>
<i>S. arlettae</i>	Humanos e aves	Patógeno oportunista
<i>S. auricularis</i>	Humanos e pele de animais	Otites externas, infecções nosocomiais e comensal
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Bovinos e homem	Intoxicação, artrite em aves, otite em cães, mastite em ovelhas e vacas, lesões de pele, síndrome do choque tóxico
<i>S. delphini</i>	Golfinhos	Lesões de pele purulentas
<i>S. hyicus</i>	Suínos	Dermatites em bovinos, equinos e gatos, epidermite exudativa em suínos e cabras
<i>S. intermedius</i>	Animais e raramente humanos	Intoxicação, dermatites, otites, conjuntivites, pneumonias, abscessos, mastite
<i>S. lutrae</i>	Lontras	Desconhecida
<i>S. pseudintermedius</i>	Cães, gatos e equinos	Desconhecida
<i>S. saprophyticus</i>	Humanos	Infecções urinárias em mulheres jovens
<i>S. schleiferi</i>	Cães e humanos	Pioderma, otites externas em cães e infecções nosocomiais

**Fonte:** Adaptado de ABIS online enciclopedia, 2014

Muita atenção tem sido dada ao estudo da resistência a antimicrobianos apresentada por algumas linhagens de *Staphylococcus*. Waters et al. (2011) realizaram um estudo caracterizando a prevalência, perfis de susceptibilidade a antibióticos e genótipos de *Staphylococcus aureus* em 136 amostras de carne bovina, suína, de peru e de frango, coletadas em 26 frigoríficos de 5 cidades distintas dos Estados Unidos. Do total de amostras, 47% estavam contaminadas pelo *Staphylococcus aureus*, sendo que 96% dos isolados eram resistentes à, no mínimo, um antimicrobiano, sendo que micro-organismos isolados resistentes à tetraciclina, ampicilina, penicilina e eritromicina foram os mais frequentes.

Rodriguez–Caturla et al. (2012) avaliaram o crescimento, sobrevivência e produção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de peitos de frango cozidos. As amostras de peito de frango foram pré-incubadas sob condições distintas de temperatura (10°C, 15°C, 37°C), pH (5,5 e 6,5) e atividade de água – Aw/0,997 e 0,960, sendo posteriormente mantidas a 10°C ou 20°C. Os resultados mostraram a capacidade de *S. aureus* em sobreviver no alimento a 10°C quando previamente incubado a baixa Aw (0,960), o que poderia constituir um risco. Em termos de crescimento a 20°C, as células previamente incubadas a pH 5,5 e Aw 0,960 tiveram uma fase de retardo mais longa e uma taxa de crescimento máxima mais lenta. A pré-incubação em condições ideais (37°C; pH 6,5; Aw 0,997) resultou em uma melhor adaptação, possibilitando um crescimento posterior mais rápido, tanto quando mantido à 10°C quanto mantido à 20°C.

#### 2.5.2. *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN)

Existem aproximadamente 30 espécies de SCN já identificadas, deste total, 12 são responsáveis por causar patologias em humanos (Tab.2). Os SCN foram considerados por muito tempo bactérias não patogênicas, mas seu papel como patógenos e a crescente incidência destes micro-organismos tem sido reconhecidos e estudados. Este grupo de bactérias é a maior causa de bacteremia associada a cateteres. A maioria das infecções é adquirida no hospital, e estudos sugerem que estas são causadas geralmente por linhagens transmitidas entre os pacientes. Outras infecções importantes relacionadas aos micro-organismos deste grupo incluem: infecções do sistema nervoso central, endocardite de válvula, infecções do trato urinário e endoftalmite. O tratamento intravenoso de infecções sistêmicas geralmente é necessário porque estas bactérias têm se tornado cada vez mais resistentes a múltiplos antibióticos. As espécies mais isoladas em amostras clínicas são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*, nessa ordem. Assim como a patogenicidade deste grupo de bactérias não está totalmente explicitada na literatura, os fatores de virulência destes micro-organismos não estão claros (Kleeman et al., 1993; Huebner e Goldmann, 1999).

**Tabela 2.** Principais espécies de SCN, hospedeiros e patogenicidade

<b>Espécie</b>	<b>Principais Hospedeiros</b>	<b>Patogenicidade</b>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> e subsp. <i>urealyticus</i>	Superfície externa de homens e animais	Endocardites, septicemia em neonatos e infecções nosocomiais
<i>S. caprae</i>	Humanos e cabras	Mastite em pequenos ruminantes, bacteremia neonatal, otites externas, infecções do trato urinário e endocardites
<i>S. carnosus</i>	Desconhecido	Desconhecida
<i>S. chromogenes</i>	Suíños, bovinos e aves	Dermatites, mastites subclínicas
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> e subsp. <i>urealyticus</i>	Humanos e primatas	Infecções do trato urinário, endocardites, artrites e septicemia
<i>S. condimenti</i>	Molho de soja	Desconhecida
<i>S. epidermidis</i>	Humanos, animais e folhas de tabaco	Infecções nosocomiais, mastites subclínicas em cabras e impetigo em suínos
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> e subsp. <i>linens</i>	Humanos, gatos e equinos	Inibem o crescimento de <i>Listeria</i> sp., desenvolvimento de <i>flavor</i> em produtos cárneos e queijos
<i>S. felis</i>	Cães e gatos	Infecções urinárias em felinos, abscessos, dermatites e conjuntivites
<i>S. fleurettii</i>	Cabras	Desconhecida
<i>S. gallinarum</i>	Aves, humanos, dragões de Komodo e gatos	Septicemia
<i>S. haemolyticus</i>	Humanos e animais	Comensais da pele, infecções em imunocomprometidos
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> e subsp. <i>novobiosepticus</i>	Humanos e animais	Comensais da pele, infecções nosocomiais em neonatos e pacientes com cateter
<i>S. kloosii</i>	Esquilos, marsupiais selvagens, ovelhas, cães e suínos	Infecções nosocomiais
<i>S. microti</i>	Ratazanas	Abcessos, granulomas e orquites
<i>S. muscae</i>	Mosca doméstica ( <i>Musca domestica</i> ) e mosca dos estábulos ( <i>Stomoxys calcitrans</i> )	Infecção de feridas
<i>S. nepalensis</i>	Cabras	Desordens respiratórias

<i>S. pasteurii</i>	Humanos e animais	Vômitos
<i>S. piscifermentans</i>	Peixes	Contribuem para a maturação e desenvolvimento de <i>flavor</i> em produtos cárneos e de peixe
<i>S. saprophyticus</i>	Animais (Bovinos)	Infecções do trato urinário em mulheres jovens
<i>S. simulans</i>	Humanos e animais	Osteomielites e infecções em próteses
<i>S. warneri</i>	Humanos e animais	Comensal da pele, bacteremia, endocardites e mastites em bovinos
<i>S. xylosum</i>	Humanos e animais	Dermatites, infecções do trato urinário, bacteremia. É utilizado como agente fermentador em produtos lácteos e cárneos

**Fonte:** Adaptado de ABIS online enciclopedia, 2014

*S. epidermidis*, espécie mais importante dentro do grupo dos SCN, faz parte da microbiota autóctone humana, normalmente colonizando a pele e menos comumente as mucosas. Esta espécie é considerada uma preocupação especial para pessoas com cateteres ou outros implantes cirúrgicos porque é capaz de formar biofilmes nesses dispositivos (Scopel et al., 2014).

No isolamento do micro-organismo em ágar sangue, *S. epidermidis* forma colônias brancas, elevadas e coesas de aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro. Estes micro-organismos são cocos resistentes, catalase positivo, coagulase negativo, anaeróbio facultativos, imóveis, Gram positivo. Testes bioquímicos indicam que essas bactérias também realizam uma reação fracamente positivo para o teste de redutase de nitrato. É positivo para a produção de urease, negativo para oxidase e pode usar glicose, sacarose e lactose para formar produtos ácidos. São normalmente sensíveis à novobiocina, característica importante para diferenciação deste com *S. saprophyticus*, que também é uma espécie coagulase negativo, porém resistente ao mesmo antimicrobiano (Linhares et al., 2013).

Marino et al. (2010) isolaram 321 linhagens de *Staphylococcus* spp. em amostras de refeições quentes e frias (52 amostras), suabes de superfícies de contato com o alimento (19 amostras) e das luvas utilizadas pelos trabalhadores (23 amostras). As amostras

foram coletadas de vários restaurantes no nordeste da Itália. Dos 321 micro-organismos isolados, 78 (24,3%) foram identificados com o *S. epidermidis*, sendo que 29 foram isolados de alimentos, 25 das mãos dos trabalhadores e 24 isolados de superfícies. Os autores avaliaram a capacidade destas bactérias em formar biofilmes nas superfícies de contato e encontraram que quatro isolados de *S. epidermidis* não produziram biofilme, porém, 59 possuíam habilidade fraca para produção de biofilme, nove possuíam habilidade moderada e seis possuíam habilidade forte.

### 2.5.3. Fatores de virulência

Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias os quais agentes patogênicos como bactérias, vírus, fungos e protozoários possuem, e estes permitem aos micro-organismos a colonização no hospedeiro, incluindo a adesão às células, a evasão ou inibição do sistema imune do hospedeiro, a entrada e saída das células, quando no caso de agente intracelular e obtenção de nutrientes a partir do hospedeiro. Os agentes patogênicos possuem uma grande variedade de fatores de virulência. Alguns são intrínsecos às bactérias (cápsulas e endotoxinas) enquanto outros são transferidos de uma bactéria a outra através de plasmídeos (algumas toxinas). *Staphylococcus* patogênicos podem produzir uma variedade destes fatores, porém cada linhagem expressa geralmente apenas alguns. A expressão dos fatores de virulência é dependente da fase de crescimento da bactéria. Cada espécie de micro-organismo produz seus fatores de virulência próprios que podem coincidir ou não. No caso dos *Staphylococcus* spp. patogênicos existem fatores de virulência que são expressos apenas pelos *Staphylococcus aureus* e outros que são comuns às espécies do gênero. Em relação aos fatores produzidos exclusivamente pelos *Staphylococcus aureus* pode-se citar: a proteína A, toxinas alfa e beta e a coagulase (Schneewind et al., 1992; Rodrigues, 2004; Türkyilmaz e Kaya, 2006; Huseby et al., 2007; Liang et al., 2011; Pereira et al., 2009).

Em relação aos fatores de virulência expressos pela maioria das espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser citados principalmente: hialuronidase, catalase, toxina gama

e leucocidina Panton-Valine (P-V), penicilinase, ácidos teicóicos, lipase, fibrolisina ou estafilocinase, peptidoglicanos da parede celular, toxina delta, cápsula e as enterotoxinas (Türkyilmaz e Kaya 2006; Abdelhak, 2009; De La Fuente et al., 2010; Mesrati et al., 2010; Waters et al., 2011; Dong-Jung et al., 2012; Hu et al., 2012; Subathra et al., 2012; Kim et al., 2013; Nakamura et al., 2013; Lattar et al., 2014).

Acreditava-se que somente os *Staphylococcus aureus* eram capazes de produzir enterotoxinas, porém, trabalhos já comprovaram que espécies como o *Staphylococcus hyicus* e *S. epidermitis* também possuem esta capacidade. As enterotoxinas são produzidas em alimentos durante a fase de crescimento do micro-organismo. São resistentes às enzimas digestivas e ao calor, não sendo destruídas pelos processos de cocção e esterilização. As enterotoxinas são superantígenos, capazes de induzir ativação inespecífica de células T e liberação de citocinas, causando alterações histológicas características no estômago e jejuno do hospedeiro. Estas alterações incluem a infiltração de neutrófilos no epitélio e na lâmina própria subjacente, com perda das bordas ciliadas no jejuno. Acredita-se que o estímulo de liberação de mediadores inflamatórios seja responsável pela êmese, que é característica da intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* (Murray, 2006).

Türkyilmaz e Kaya (2006) isolaram um total de 180 cepas de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite bovina, cães com otite externa e galinhas com infecções variadas. Os isolados foram identificados como *S. aureus* (29,4%), *S. hyicus* (16,7%), *S. intermedius* (3,9%), *S. chromogenes* (16,1%), *S. lentus* (13,3%), *S. epidermidis* (11,1%), *S. simulans* (7,8%) e *S. haemolyticus* (1,7%). Os pesquisadores estudaram também os fatores de virulência produzidos pelos *Staphylococcus* isolados, com o objetivo de determinar a relação entre estes fatores de virulência e linhagens de SCP e SCN. A taxa de positividade para desoxirribonuclease (DNase), teste de termonuclease (TNase), presença da cápsula, testes de formação de lodo e biofilme, hemólise e hemaglutinação por linhagens coagulase positivo foram 42,2%, 43,3%, 53,3%, 77,8%, 74,4%, 58,9%, 46,7%, e para as cepas coagulase negativo foram 54,4%, 5,6%, 13,3%, 44,4%, 36,7%, 28,9% e 41,1%, respectivamente. Os autores concluíram em seu estudo que existem

espécies que representam um perigo potencial para humanos e animais tanto no grupo SCP quanto no grupo SCN.

#### 2.5.4. Enterotoxinas

As toxinas estafilocócicas (SE), também chamadas enterotoxinas, 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 enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp., principalmente *Staphylococcus aureus*. As SE são sorologicamente distintas, porém exibem semelhanças tanto nas suas múltiplas atividades biológicas quanto em suas sequências peptídicas. Dentre suas propriedades estão a habilidade de causar emese e gastroenterites 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. Porém, distinguem-se pela presença de epítomos específicos. Assim sendo, as diferentes linhagens enterotoxigênicas podem expressar SE antigenicamente distintas com atividades biológicas similares (Balaban e Rasooly, 2000; Hennekinne et al., 2010; Santiliano et al., 2011).

A intoxicação estafilocócica é resultante da ingestão de alimentos contaminados por SE termoestáveis pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas de SCP durante sua multiplicação no substrato. Existem também relatos de SCN produtores de enterotoxinas (Freitas et al., 2004; Hennekinne et al., 2007; Ombui e Mathenge, 2007).

As SE estão classificadas na categoria B de agentes de risco biológico, por resultarem em moderada morbidade e baixa mortalidade. Porém, mudanças na temperatura, pureza, composição e do pH do meio em que estas moléculas se encontram, podem fazer com que percam sua atividade. No entanto, mesmo quando inativadas, as toxinas ainda estarão presente como moléculas biologicamente completas. Um estudo demonstrou

que a atividade das SE pode ser recuperada pelo tratamento de pH elevado, por exemplo, demonstrando que o mecanismo exato de inativação pelo calor e reativação pelo pH não forem resolvidos, o tratamento térmico de alimentos que contenham SE pode não ser a melhor maneira de aumentar a segurança alimentar. A intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contaminados por SE e é caracterizada pela evolução da doença dentro de 1 a 6 horas após ingestão. Os sintomas apresentados são náusea, vômito, dor abdominal e diarreia, geralmente nesta ordem (Schwabe et al., 1990; Olivera et al., 1995; Balaban e Rasooly, 2000; Santiliano et al., 2011).

Estas proteínas podem ser codificadas em prófagos, plasmídeos ou ilhas de patogenicidade. A possibilidade produção de enterotoxinas depende do tipo de toxina, linhagem e meio de cultura no qual o micro-organismo se encontra. Nem todos *Staphylococcus* são produtores de SE, e mesmo os que são, podem produzi-las de forma insuficiente para causar intoxicação (Oliveira et al., 1995; Loncarevic et al., 2004; Hennekinne et al., 2010).

Pesquisas relacionadas a intoxicações alimentares provocadas por *Staphylococcus* isolaram, até o presente, momento 22 SE ou tipo-enterotoxinas (SEL), sendo estas: as enterotoxinas A (SEA), B (SEB), C<sup>1</sup> (SEC<sup>1</sup>), C<sup>2</sup> (SEC<sup>2</sup>), C<sup>3</sup> (SEC<sup>3</sup>), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SELJ), K (SELK), L (SELL), M (SELM), N (SELN), O (SELO), P (SELP), Q (SELQ), R (SELR), S (SES), T (SELT) e U (SELU). A divisão da enterotoxina estafilocócica C em três subclasses C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup> e C<sup>3</sup> é baseada no ponto isoelétrico de cada uma delas (Bergdoll et al., 1965; Bergdoll et al., 1971; Rosec e Gigaud, 2002; Hennekinne et al., 2007; Ombui e Mathenge, 2007; Ono et al., 2008).

Em 75% dos surtos de intoxicação alimentar as linhagens isoladas são produtoras de SEA e em menor número SEB, SEC<sup>1</sup>, SEC<sup>2</sup>, SEC<sup>3</sup> e SED. Aproximadamente 5% dos surtos são causados por enterotoxinas estafilocócicas desconhecidas (Bergdoll, 1983; Hennekinne et al., 2007; Ombui e Mathenge, 2007; Ono et al., 2008).

Rajkovic et al. (2006) realizaram um estudo avaliando a técnica de PCR em tempo real (PCR *Realtime*) para detecção e quantificação de enterotoxina B em alimentos. Os

resultados revelaram o aparecimento de SEB após 4 h de incubação a 22°C, 37°C e 42°C, sendo que as quantidades totais de SEB produzidos pelas duas linhagens testadas foram maiores a 42°C do que a 37°C. Estes resultados demonstram a interferência da temperatura no crescimento e posterior produção de toxinas pelos *Staphylococcus*.

Estudos de Hennekinne et al. (2007) mostram que a dose tóxica para que as SE A e H induzam vômitos e diarreia é de apenas 40 ng. A SEA é a mais relatada nos casos de surtos por intoxicação alimentar, principalmente porque a SEA juntamente com a SEB, exibem atividade emética intensa em primatas, sendo assim de fácil identificação (Ortega et al., 2010).

Um estudo de 359 surtos ocorridos no Reino Unido entre 1969 e 1990 relatou que dentre as linhagens de *S. aureus* isolados nos alimentos, 79% eram produtoras de SEA. Além disso, o estudo também mostrou que a carne bovina, de frango e seus derivados foram veículos em 75% dos incidentes. Em 56,9% dos surtos, somente a SEA foi detectada, seguidas pelas outras toxinas SED, SEB, SEC ou SEB e SED em 15,4; 3,4; 2,5 e 1,1% dos casos, respectivamente (Argudín et al., 2010).

Em comparação às outras enterotoxinas, a SED é produzida em quantidades reduzidas.

Pereira et al. (1991) relataram, em seu estudo, que linhagens que produzem esta SE em poucas quantidades, as produziam na proporção de nanogramas mL<sup>-1</sup> quando em meio laboratorial, sendo esta quantidade não detectável por métodos de difusão em ágar gel. Entretanto, quando estas mesmas linhagens foram inoculadas em alimentos, foram capazes de produzir a SE em níveis capazes de gerar doença.

Já a SEE tem sido pouco relatada em alimentos e carcaças de animais, e seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica tem sido demonstrado em raras ocasiões. Argudín et al. (2010) citam a ocorrência de seis surtos ocorridos na França no final de 2009, causados pela ingestão de queijo produzido com leite cru, onde se isolou esta SE. Existem também relatos de surtos semelhantes nos EUA e Reino Unido.

Pereira et al. (2009) realizaram um estudo para caracterizar *S. aureus* quanto a produção de enterotoxinas e presença de genes para a produção destas. Os micro-organismos foram isolados de diversos produtos de origem animal (carne crua e derivados; leite e derivados), coletados em estabelecimentos no norte de Portugal. Foram isolados no total, 148 linhagens de SCP, sendo que 147 destes foram confirmados como pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* e quarenta por cento destes foram considerados enterotoxigênicos quando testados pelo método ELFA (*Enzime Linked Immunofluorescent Assay*), sendo os micro-organismos isolados de carne crua e derivados, em sua maioria. Em relação à presença de genes para SE testados por PCR, 69% dos *Staphylococcus aureus* encontrados apresentavam um ou mais genes. Onze genótipos foram observados, destes os mais comuns foram: SEA SEG, SEA SEG SEI e SEG SEI com 26, 23 e 25% respectivamente.

Al-Ghamdi (2012) isolou *Staphylococcus* a partir 20 amostras de produtos congelados de frango processados comercializados em Al Baha, Arábia Saudita e encontrou 12 linhagens enterotoxigênicas. Os tipos de SE produzidas foram: SEA (10 cepas) e SEC (2 cepas).

Para avaliar o comportamento de SCN quanto à capacidade de desenvolvimento e produção de enterotoxina estafilocócica (SE), Pereira et al. (2001) inocularam, de maneira isolada e em duplicata, leite integral “tipo longa vida” e presunto cozido com 14 linhagens teste de *S. caprae* (duas amostras); *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* (duas amostras), *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosus* (duas amostras) e *S. warneri* (duas amostras). Após 48h de incubação à 30°C, as contagens realizadas foram de  $10^6$  até  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> do alimento. Mesmo com as altas contagens microbianas, os autores não detectaram a presença de SE em nenhuma das amostras, evidenciando que existem poucos micro-organismos neste grupo capazes de produzir SE.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A fase experimental de coleta das amostras foi realizada em um abatedouro comercial de frangos, localizado na região Centro-Oeste de Minas Gerais, e as análises microbiológicas foram conduzidas no Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizado na Central de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA) em Contagem - Minas Gerais.

### **3.1. Abatedouro**

No abatedouro onde a coleta de amostras foi realizada, estão implantados os programas de qualidade industrial (BPF, PPHO e APPCC). Os turnos de trabalho são divididos em três: o primeiro na parte da manhã com início às 7:00h e término às 12:00h, o segundo na parte da tarde que inicia às 13:00h e termina às 18:00h e, o último turno, noturno, que inicia às as 19:00h e termina às 0:00h. A sanitização completa das salas é realizada somente após o fim do terceiro turno de trabalho, durante a madrugada. Porém, entre os turnos é feita uma lavagem utilizando apenas água quente sob pressão. As amostras foram coletadas no primeiro e segundo turnos de trabalho do abatedouro.

### **3.2. Amostras**

Foram coletadas 288 amostras de carcaças inteiras de frangos de corte, sem pele, antes da entrada na sala de corte (estas foram necessárias para garantir a homogeneidade microbiológica por turno das amostras antes da entrada destas na sala de cortes onde a temperatura foi controlada) e 288 amostras de cortes de peito de frango produzidos em uma sala de cortes com temperatura ambiente controlada. Conforme as amostras eram coletadas, elas passavam por túnel de congelamento e posteriormente eram armazenadas à -18°C, sendo mantidas nesta temperatura até chegada ao LSMA. As temperaturas das carcaças coletadas antes da entrada na sala de processamento e também dos cortes de peitos de frango foram mensuradas por meio de termômetro de (Fig.1 e 2).



**Figura 1.** Carcaça após o chiller



**Figura 2.** Peito na sala de cortes

### 3.3. Tratamentos

Foram utilizados quatro tratamentos, sendo estes repetidos durante seis dias de trabalho, ao longo de dois turnos (manhã e tarde), onde cada turno foi considerado uma repetição.

Em cada turno foram coletadas seis amostras de carcaça inteira antes da entrada na sala de corte (duas amostras foram coletadas no horário inicial do turno, duas amostras no meio do horário e outras duas coletadas ao final do turno de trabalho) e seis amostras do corte de peito na saída da sala de cortes (duas amostras foram coletadas no horário inicial do turno, duas amostras no meio do horário e mais duas amostras coletadas ao final do turno de trabalho). Foi realizado um pool de cada seis amostras de carcaça (este foi coletado de partes aleatórias do peito sem a pele), e um pool de cada seis amostras de cortes de peito que foram analisados em duplicata.

As coletas das carcaças, após o gotejamento, antes da entrada na sala de cortes, foram necessárias para avaliar a contaminação inicial e presença de enterotoxinas das amostras, além de garantir a homogeneidade destas antes de entrar na fase experimental.

Os quatro tratamentos utilizados no trabalho foram delimitados através de alteração controlada da temperatura ambiente da sala de cortes/desossa (Fig.3). No primeiro

tratamento as amostras foram coletadas com temperatura ambiente controlada de 12°C. No segundo, o ambiente foi colocado a uma temperatura de 14°C. No terceiro tratamento a sala de cortes/desossa encontrava-se a 16°C, e por fim, no quarto e último tratamento, coletou-se as amostras sob a temperatura de 18°C.



**Figura 3.** Sala de cortes/desossa

Durante todo o experimento, as temperaturas máximas e mínimas da sala de cortes, nos diferentes tratamentos, foram monitoradas e encontram-se registradas na Tab.3.

**Tabela 3.** Médias das temperaturas (°C) e desvios-padrão mensuradas na sala de cortes e desossa nos diferentes tratamentos

<b>Tratamentos</b>	<b>Temperatura média (°C)</b>
12°C	12,02 ± 0,11
14°C	14,05 ± 0,10
16°C	16,10 ± 0,10
18°C	18,02 ± 0,15

O tempo que as carcaças levaram para sair do gotejamento até o final do processamento e embalagem foi de 3 minutos e as temperaturas das carcaças e dos cortes foram medidas após o gotejamento e ao final do processamento.

### **3.4. Variáveis analisadas**

#### **3.4.1. Contaminação ambiental na sala de cortes/desossa**

Para verificar a contaminação ambiental na sala de cortes/desossa utilizou-se a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbicos de acordo com a metodologia adaptada de Marshall (1992). Foram expostas durante 15 minutos três placas de Petrifilm™ AC (3M™, Maplewood, Minnesota, USA) hidratadas com 1mL de solução salina peptonada 0,1% estéril. Cada placa foi posicionada em um ponto distinto da sala de cortes, durante a segunda coleta de amostras de peito de frango. A exposição de placas foi realizada no meio de cada turno de trabalho utilizado no experimento, ou seja, às 10:00h e às 14:30h. Após exposição, as placas foram incubadas em estufa a 35°C ±1°C por 48 horas e após este período foi realizada a contagem de colônias visíveis. O resultado foi expresso em densidade microbiana (nº de UFC/m<sup>2</sup>/hora), que foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{Densidade microbiana} = \text{nº UFC} \times 60 \text{ min}/15\text{min} \times 10000 \text{ cm}^2/20 \text{ cm}^2.$$

#### **3.4.2. Isolamento e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positivo e coagulase negativo**

Para isolamento do micro-organismo, retiraram-se fragmentos de locais aleatórios da amostra até constituírem 25 g ± 0,2 g (Fig. 4). Foram preparadas quatro diluições, utilizando-se solução salina peptonada 0,1% como diluente. Para a primeira diluição

( $10^{-1}$ ) adicionou-se 25g da amostra em 225 mL do diluente, seguido de homogeneização por 60 segundos. Para o preparo da segunda diluição, foram transferidos 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio estéril, contendo 9 mL do mesmo diluente e assim sucessivamente até a diluição de  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL (retiradas de cada diluição, a partir da diluição  $10^{-2}$ ) foram semeadas em placas contendo meio de cultura Baird-Parker (MERK®) enriquecido com emulsão de gema de ovo em solução salina 0,85% (1:1) e solução de telurito de potássio 1%. Após espalhamento da alíquota, com auxílio de alça Drigalsky, as placas de Petri foram invertidas e incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas, com posterior contagem de colônias típicas e atípicas. A leitura foi feita a partir de qualquer placa que apresentasse crescimento de colônias (Fig.5). Cinco colônias típicas (colônias negras brilhantes, com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e cinco colônias atípicas (colônias acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos) foram selecionadas quando presentes. Na ausência deste número de colônias o máximo possível foi selecionado. Com o auxílio de uma alça de platina, cada uma das colônias foi inoculada em tubos contendo 0,3 mL de caldo BHI, separadamente para confirmação. Os tubos foram incubados em estufa a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Realizou-se então a prova da coagulase, através da adição de 0,3 mL de plasma de coelho oxalato nos tubos previamente incubados. Estes então sofreram nova incubação em estufa bacteriológica a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 6 horas e posteriormente foi feita a avaliação da formação ou não de coágulo no tubo, sendo a leitura realizada da seguinte forma (Brasil, 2003):

- Reação negativa: Não houve formação de coágulo
- Reação 1+: Coágulo pequeno e desorganizado
- Reação 2+: Coágulo pequeno e organizado
- Reação 3+: Coágulo grande e organizado
- Reação 4+: Coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprende quando o tubo é invertido.



**Figura 4.** Retirada de 25g do *pool* para análise



**Figura 5.** Placa de Petri com colônias típicas

### 3.4.3. Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup>, C<sup>3</sup>, D e E)

As enterotoxinas foram pesquisadas através da metodologia ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). Para isto, 25g das amostras de peito de frango (retiradas de partes aleatórias do *pool* de amostra com de tesoura estéril) foram homogeneizadas com 25 mL de solução de extração (Tampão TRIS, 0,3M, pH 8,0) em tubo Falcon de 50 mL, durante 3 minutos para obtenção de uma suspensão homogênea. Em seguida as amostras permaneceram em repouso pelo prazo de 15 a 30 minutos em temperatura ambiente (18-25°C). Após este período, foram homogeneizadas em centrífuga durante 15 minutos a 3000-5000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 50 mL, sendo filtrado em gaze estéril. O pH do líquido filtrado, quando necessário, foi ajustado para 7,5 e 8,0 com hidróxido de sódio 1N. Foram pipetados 500 µL de líquido filtrado que em seguida foram transferidos para uma barreta VIDAS<sup>TM</sup> SET2 para execução do teste. Esta barreta é composta por 10 poços cobertos por uma folha de alumínio selada e etiquetada. O primeiro poço apresenta uma parte perfurada para

facilitar a introdução da amostra. O último poço é uma microcubeta que permite a leitura por fluorimetria. Os poços intermediários contêm os diferentes reagentes necessários à análise. As barretas então foram inseridas no equipamento VIDAS™, o qual realizou automaticamente a leitura das enterotoxinas em 80 minutos (VIDAS™ *Staph Enterotoxin* – SET2, bioMerioux - Hazelhood).

O sistema Vidas™ 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 cálculo do Valor de Fluorescência Relativo (RFV - *relative fluorescence value*) é o resultado da diferença das duas medidas. O produto do RFV das amostras pelo RFV do calibrador resulta no valor do teste. 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.

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados do experimento, para todos os parâmetros analisados utilizou-se controle positivo e negativo concomitante a análise.

### **3.5. Delineamento Experimental**

O ensaio das análises foi conduzido no delineamento experimental inteiramente ao acaso, sendo o corte do peito a covariável e estimativa de modelos de regressão para os tratamentos. Foram avaliados quatro tratamentos, determinados pela temperatura ambiente a que foi submetida à sala de cortes (12°C, 14°C, 16°C e 18°C), com 12 repetições cada. Para a avaliação das variáveis microbiológicas foi realizada a transformação de dados e para aqueles que apresentaram distribuição normal (contaminação ambiental) foi utilizado o teste de Tukey, em nível de significância de 5%, enquanto que para aqueles que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade (*Staphylococcus* spp.) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis

também em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002). Os dados de temperatura das carcaças e dos cortes de peito de frango foram avaliados utilizando o teste de Tukey, em nível de significância de 5%. Os resultados da pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas foram submetidos a análises descritivas devido ao baixo número de amostras positivas observadas no experimento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Contaminação das carcaças após o gotejamento

Os resultados médios das pesquisas de SCP e SCN, para as amostras após o gotejamento estão demonstrados na Tab.4. As análises das amostras coletadas antes da entrada na sala de cortes, após o gotejamento, foram realizadas para avaliar as condições microbiológicas iniciais das carcaças.

**Tabela 4.** Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo (UFC g<sup>-1</sup>) e *Staphylococcus* coagulase negativo (UFC g<sup>-1</sup>) em carcaças de frangos de corte

Tratamentos	SCP	SCN
12°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>
14°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>
16°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup>
18°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>

Em todas as placas de Petri onde se isolou SCP o número de colônias visíveis estava fora do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia aplicada, sendo assim, o resultado constatado foi expresso como < 1,0 x 10<sup>-2</sup> UFC g<sup>-1</sup> estimado para todas as amostras.

Em relação ao SCN, somente no tratamento a 16°C a contagem foi de 3,5 x 10<sup>-2</sup> UFCg<sup>-1</sup>, nos demais tratamentos a contagem encontrada foi de <1,0 x 10<sup>-2</sup> UFC g<sup>-1</sup> est., porém

não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os valores encontrados para as amostras coletadas na sala do chiller após o gotejamento.

Os resultados demonstraram que todas as carcaças utilizadas no trabalho apresentaram condições de igualdade, sendo considerados ideais para a avaliação experimental. As baixas contagens microbianas encontradas demonstraram que o abate estava sendo realizado de acordo com o conjunto de operações preconizados pela Portaria nº210 (Brasil, 1998) e que, a qualidade do produto foi alcançada, para *Staphylococcus* spp. Foi possível verificar também que os procedimentos de controle da qualidade (BPF, PPHO e APPCC) implantados na indústria de abate proporcionaram uma forma de abordagem sistemática no sentido de identificar, avaliar e controlar o risco, levando qualidade ao processamento e maior confiabilidade microbiológica aos produtos finais.

Os resultados da aferição da temperatura das amostras coletadas após o gotejamento estão registrados na Tab.5.

**Tabela 5.** Temperatura média das carcaças inteiras após o gotejamento

Tratamentos	Temperatura das carcaças (°C)
12 °C	4,39
14 °C	3,99
16 °C	4,92
18 °C	4,62

Médias semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p> 0,05$ )

Quanto à temperatura das carcaças após o gotejamento, não houve diferença estatística entre os tratamentos. As carcaças saíram do resfriamento com temperatura média de 4,4°C, estando de acordo com a Portaria nº210, que preconiza que a temperatura das carcaças no final do processo de pré-resfriamento deve ser igual ou inferior a 7°C (Brasil, 1998). Os resultados em relação à temperatura das carcaças demonstram que as amostras ao entrarem na fase experimento eram homogêneas.

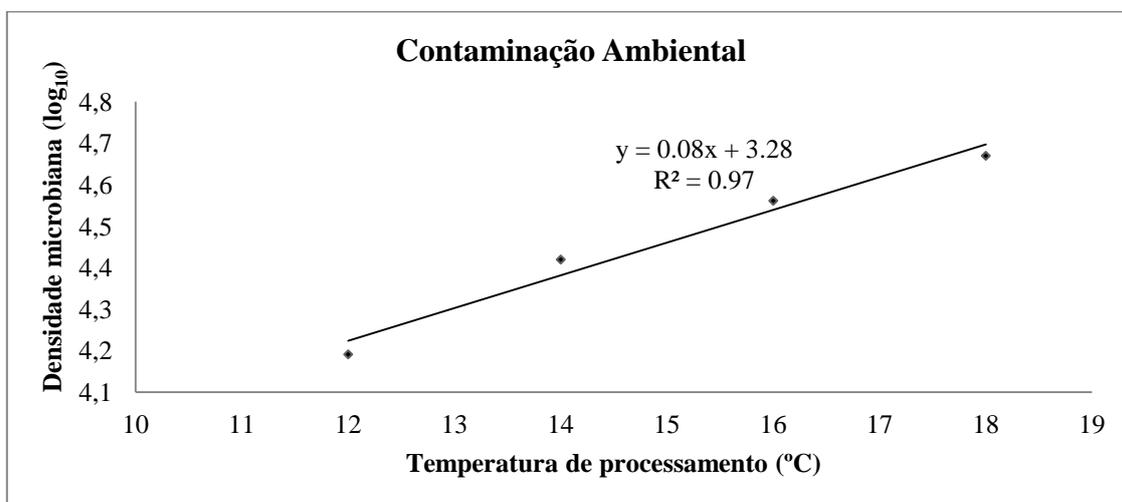
## 4.2. Contaminação Ambiental

Os resultados das análises da contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, utilizados para avaliação da contaminação ambiental da sala de cortes, submetida a diferentes temperaturas ambientais, estão descritos na Tab.6 e sua representação gráfica, na Fig.6. Foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a densidade microbiana encontrada e as diferentes temperaturas ambientes da sala de corte.

**Tabela 6.** Resultados das análises de contaminação ambiental da sala de cortes submetida a diferentes temperaturas ambientais

Temperatura (°C)	Densidade microbiana (UFC/m <sup>2</sup> /hora)
12°C	$2,0 \times 10^4$ a
14°C	$3,5 \times 10^4$ ab
16°C	$5,2 \times 10^4$ ab
18°C	$6,0 \times 10^4$ b

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P = 0,01$ ). CV = 8,0%



**Figura 6.** Gráfico de regressão linear dos valores de contaminação ambiental em função das diferentes temperaturas ambientais utilizadas

Os resultados apresentados demonstraram que ocorreu um aumento significativo da contagem média de micro-organismos mesófilos aeróbios no ambiente à medida que a temperatura da sala de cortes aumentou. Quando colocada a 12°C, a sala de cortes/desossa apresentou contagem de  $2,0 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>, já no tratamento de 14°C o

resultado encontrado foi  $3,5 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ , estatisticamente igual ao encontrado quando temperatura ambiente da sala estava em  $16^\circ C$  ( $5,2 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ ). O tratamento de  $18^\circ C$  apresentou contagens de  $6,0 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ , resultado estatisticamente superior aos demais.

Haas et al. (2005) encontraram uma variação média de  $1,1 \times 10^6$  até  $4,7 \times 10^6$  UFC/ $m^3$  na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos, na sala da pendura dos frangos e na área de separação da vesícula biliar, respectivamente. Porém, uma contaminação ambiental maior é esperada nestes locais quando comparados à sala de cortes, uma vez que estas duas seções estudadas pelos autores fazem parte da área suja do abatedouro e a sala de cortes/desossa faz parte da área limpa.

A avaliação dos valores de contaminação ambiental em função das diferentes temperaturas ambientes utilizadas apresentou uma tendência linear estatisticamente significativa, ou seja, o aumento progressivo da temperatura causa o mesmo efeito na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos. Quanto maior a temperatura ambiente, maior a contaminação ambiental da sala de cortes.

Apesar da diferença significativa encontrada entre os tratamentos, foi observado um baixo índice de contaminação ambiental da sala, demonstrado pelos baixos valores encontrados de contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios. A temperatura ambiente ótima de crescimento destes micro-organismos encontra-se entre  $30^\circ C$  a  $40^\circ C$ , podendo haver crescimento em temperaturas de  $20^\circ C$  (Riedel, 1987). Os quatro tratamentos térmicos ao qual a sala de cortes foi submetida encontravam-se abaixo desta temperatura.

### **4.3. Temperatura das amostras de peito de frangos de corte**

As temperaturas médias das amostras de peito de frango coletadas na sala de cortes/desossa exposta a diferentes temperaturas ambiente estão demonstradas na Tab.7.

**Tabela 7.** Temperaturas médias das amostras de peitos de frangos de corte coletadas em salas de cortes submetidas às temperaturas ambiente

Tratamentos	Temperatura das carcaças (°C)
12°C	8,02 a
14°C	8,52 ab
16°C	8,37 ab
18°C	9,14 b

Médias seguidas de letras distintas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis

Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os quatro tratamentos em relação à temperatura das amostras de peito de frangos de corte. Quando a sala de cortes/desossa encontrava-se sob a temperatura controlada de 18°C a temperatura ambiente influenciou significativamente na temperatura das amostras (9,14°C) que foi superior à temperatura das amostras processadas na sala à 12°C (8,02°C). A legislação preconiza que a temperatura das carnes manipuladas na seção de cortes não pode exceder 7°C, contudo as médias das temperaturas das amostras de peito, em todos os tratamentos, apresentaram-se fora deste padrão (Brasil, 1998).

Contudo, trabalhos demonstram que em temperaturas de até 15°C os *S. aureus* não conseguem se multiplicar de forma considerável. Malheiros et al. (2009) verificaram que após 24h, houve aumento significativo na contagem de *S. aureus* incubados a 20°C em carne de frango, porém entre 7°C e 15°C as contagens foram insignificantes. Segundo estes autores, mesmo quando a temperatura da carcaça estiver um pouco acima do preconizado, não há risco em relação à multiplicação de *S. aureus* na carne de frango, o que leva também à diminuição da possibilidade de produção de enterotoxinas, pois para que ocorra produção destas é necessária uma contagem bacteriana acima de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. Necedová et al. (2012) demonstraram que temperatura de refrigeração de 8°C impediram a multiplicação do *S. aureus*, evitando que este alcançasse a contagem crítica de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>.

#### 4.4. Contaminação por SCP e SCN

Os resultados encontrados de isolamento e contagem de SCP e SCN nas amostras de peito de frangos de corte sem pele processados em sala de cortes submetidas a diferentes temperaturas ambientes controladas estão demonstrados na Tab.8.

**Tabela 8.** Contagem médias de SCP (UFC g<sup>-1</sup>) e SCN (UFC g<sup>-1</sup>) nas amostras de peitos de frango coletadas na sala de cortes submetida a diferentes temperaturas ambiente

Tratamentos	SCP	SCN
12°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,15 x 10 <sup>5</sup>
14°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,05 x 10 <sup>5</sup>
16°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	7,50 x 10 <sup>4</sup>
18°C	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	2,00 x 10 <sup>4</sup>

Médias semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis (p>0,05)

Em todas as placas de Petri onde se isolou SCP o número de colônias visíveis estava fora do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia aplicada, sendo assim, o resultado encontrado foi <1,0 x 10<sup>-2</sup> UFC g<sup>-1</sup> estimado para todas as amostras. Penteado e Esmerino (2011) ao analisarem amostras de cortes de frango encontraram 40% das 50 amostras analisadas positivas para *S. aureus*, com contagens variando entre 11 e 47 UFC g<sup>-1</sup>.

Kuchenbecker (2009), com objetivo de avaliar a contaminação de carcaças de frangos de corte por *S. aureus*, analisou 3.748 amostras de frangos de corte coletadas de diversos estabelecimentos industriais pelo período de um ano e encontrou apenas 6,3% de amostras positivas para este micro-organismo. Maroso (2008) estudou o efeito da redução da temperatura (média de 19,5°C para média de 11,3°C) de carcaças de frango na multiplicação de micro-organismos. A contagem de SCP se manteve constante, com valores não superiores a 2,0 x 10<sup>1</sup> UFC g<sup>-1</sup>, resultados que corroboram com os encontrados.

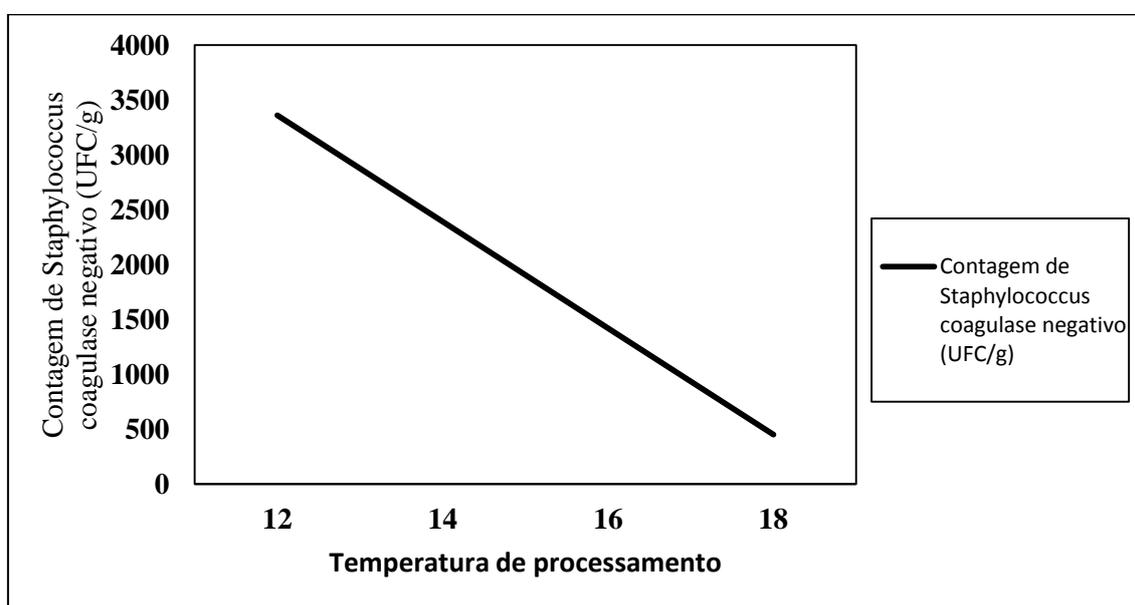
Em relação à contaminação por SCN, apesar de ter sido encontrado uma contagem mais alta, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

A equação de regressão da contagem de SCN em função das diferentes temperaturas ambientes utilizadas na sala de cortes de frangos está apresentada na Tab.9 e sua representação gráfica na Fig.7.

**Tabela 9.** Equação de regressão da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo da sala de cortes em função das diferentes temperaturas ambientes utilizadas

Variável	Equação	R <sup>2</sup>
SCN	$y = 9181,25 + 485x$	0,9606

Teste de Tukey, p=0,0072



**Figura 7.** Gráfico de regressão dos valores de contaminação ambiental em função das diferentes tratamentos

Na contagem de SCN houve um decréscimo à medida que se aumentava a temperatura da sala de cortes. Fato este demonstrado pela equação de regressão.

A baixa contagem de *Staphylococcus* spp. deve-se ao fato de que estes microorganismos não são bons competidores, ou seja, são bactérias que não conseguem se multiplicar expressivamente na presença de bactérias concomitantes. Principalmente em alimentos crus, onde a microbiota residente é mais abundante, como é o caso do frango (Hirsh e Lee, 1999). Esta característica pôde ser observada nos resultados do trabalho, uma vez que houve um comportamento contrário quando comparadas as contagens de

micro-organismos aeróbios mesófilos com a contagem de SCN. Para o primeiro grupo de bactérias, à medida que se aumentou a temperatura ambiente da sala de cortes aumentou também a contaminação ambiental. Já no isolamento e contagem de SCN, na medida em que a temperatura da sala de cortes aumentou, o número de micro-organismos do grupo diminuiu.

Diferente dos resultados encontrados, Menezes (2013), com o objetivo de verificar a contaminação de carcaças de frangos de corte por *Staphylococcus* spp., avaliou 240 amostras de carcaças de frangos de corte oriundas de vários abatedouros do Estado de Minas Gerais, encontrou 100% de amostras foram positivas para este micro-organismo, sendo que 69% das amostras apresentaram contagens acima de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. Estes altos índices de *Staphylococcus* spp. são preocupantes pois deve ser considerado o grande potencial enterotoxigênico de algumas cepas.

#### **4.5. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (A, B, C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup>, D e E)**

Não foi observada a presença de enterotoxina em nenhuma das amostras analisadas, tanto em relação às amostras após o gotejamento, quanto em relação às amostras de peito da sala de cortes. Este fato pode ser explicado pela baixa contagem de SCP (*S. aureus*) maior responsável por intoxicações alimentares dentre as espécies do gênero. Além disso, a temperatura de todas as amostras esteve abaixo de 15°C, valores considerados baixos para multiplicação exponencial deste gênero microbiano.

Schmitt et al. (1990), estudando os limites de temperatura para crescimento e produção de enterotoxinas em linhagens de *S. aureus* isolados de alimentos, encontraram uma temperatura mínima de 7°C para multiplicação, após 7 dias de incubação, e 15°C para produção de enterotoxina, salientando que estas temperaturas podem variar de acordo com a linhagem do micro-organismo, bem como com o tipo de enterotoxina produzida. Corroborando com estes resultados, Necidová et al. (2012) demonstraram que as três linhagens do mesmo micro-organismo isoladas em seus estudos produziram SE

exclusivamente com temperatura ambiente de 15°C. Os autores concluíram que a produção de enterotoxina é improvável de ocorrer em temperaturas abaixo de 10°C.

Para produção de SE, estas bactérias necessitam de temperatura, pH e atividade de água (Aw) ideais, além de nutrientes disponíveis e uma baixa competição com outros micro-organismos. Valero et al. (2009) verificaram que a 8°C os *S. aureus* foram capazes de se multiplicar somente quando o pH e a Aw estavam nos padrões ideais de 6,5 e 0,99, respectivamente. Necidová et al. (2012) encontraram valores semelhantes, concluindo que, para produção das SE é necessária faixa ideal de pH entre 6 a 7 e temperaturas acima de 8°C.

Além disso, a contagem tanto de SCP, quanto de SCN, encontraram-se consideravelmente abaixo de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>, valor mínimo para que o micro-organismo seja capaz de produzir toxinas.

Pereira et al. (2001) demonstraram que mesmo com contagens entre  $10^6$  e  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>, SCN inoculados em leite integral “tipo longa vida” e presunto cozido, posteriormente incubados a 30°C por 48h, não foram capazes de produzir enterotoxinas.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem concluir que não há interferência da temperatura ambiente da sala de processamento no crescimento do micro-organismo *Staphylococcus*. As contagens de SCP e SCN foram consideradas muito baixas, independente das temperaturas utilizadas na sala de processamento. Também não foi observada a presença de enterotoxinas produzidas por estes micro-organismos.

A contaminação por *Staphylococcus aureus* em carcaças e cortes de frango está mais relacionada às condições higiênicas e sanitárias de todo processamento do alimento, como as boas práticas de higiene dos funcionários, assim como a boa higienização de utensílios e maquinários utilizados e do ambiente, do que a temperatura da sala de processamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAK, D. Alternative method for genetic transformation of *Pasteurella multocida* X73 using a hyaluronidase-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of Microbiological Methods*, v. 78, p. 25–27, 2009.

ABIS online Encyclopedia. The Great Bacteria Book. Genus *Staphylococcus*. Disponível em < <http://www.tgw1916.net/Staphylococcus.html>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2013.

AL-GHAMDI, A. Y. Incidence of *Staphylococcus aureus* contamination of marketed Processed Chicken products with special reference to its antibiotics sensitivity collected from Al Baha city markets, Saudi Arabia. *Pak. J. Food sci.*, v. 22, n. 3, p. 168-170, 2012.

ARAÚJO, A. F. D. V.; ZANNONI, C.; LIMA, D. B. S.; et al. Identificação de fatores de riscos ocupacionais no processo de abate de bovinos. *Cad. Pesq.*, São Luís, v. 19, n. 3, 2012.

ARGUDÍN, M.À.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Review: Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 1-10, 2000.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C. *J. Bacteriol.*, v. 90, n. 5, p. 1481-1485, 1965.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R. N.; et al. Identification of Enterotoxin E. *Infec. Immun.*, v. 4, n. 5, p. 593-595, 1971.

BOLTON, D.J.; MEREDITH, H.; WALSH, D.; et al. The effect of chemical treatments in laboratory and broiler plant studies on the microbial status and shelf-life of poultry. *Food Control*, v. 36, n. 1, p. 230–237, 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Divisão de Normas Técnicas – DNT. Decreto Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Alterado pelo decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1997a.

BRASIL. Instrução Normativa DAS (Secretaria do Desenvolvimento Agropecuário), nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas e para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 210, 16 de maio de 2005. Aprova os Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1998a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores / industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal - SIF, de acordo com o manual genérico de procedimentos, anexo à Portaria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1998b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico; "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.472, de 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer

fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova, na forma dos textos anexos, o "Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos", as "Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos" e o "Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1993.

BRASIL. Ministério do trabalho e emprego. Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943. Aprova a Consolidação das Leis do Trabalho (CLT). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1943.

BRASIL. Ministério do trabalho e emprego. Portaria nº 21, de 26 de dezembro de 1994. Define o mapa oficial do Ministério do Trabalho para atender o disposto no art. 253 da CLT. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1994.

BRASIL. Ministério do trabalho e emprego. Portaria nº 3.214, de 08 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 15 – Anexo 9. Atividades e operações insalubres. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1978.

BUZANELLO, M. R. Influência de variáveis ambientais em frigorífico da unidade climática subtropical sul sobre os trabalhadores expostos a baixas temperaturas. 2003. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CVE/SES. Centro de Vigilância Epidemiológica/Secretaria de Estado da Saúde. Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas: Normas e Instruções. São Paulo, 2002.

DAVIES, A.; BOARD, R. The Microbiology of Meat and Poultry. 1ed. Londres: Blackie Academic e Professional, 1998. 332p.

DE LA FUENTE, R.; DÍEZ, R. M.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; et al. Restoring catalase activity in *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* leads to loss of pathogenicity for lambs. *Vet. Res.*, v. 41, n. 41, 2010.

DOBRANIC, V.; ZDOLEC, N.; RACIC, I.; et al. Determination of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci from autochthonous Croatian fermented sausages. *Veterinarski Arhiv.*, v. 82, n. 2, p. 145-152, 2013.

DONG-JUN, J.; JANG-HYUN, A.; KUROKAWA, K.; et al. Specific Serum Ig Recognizing Staphylococcal Wall Teichoic Acid Induces Complement-Mediated Opsonophagocytosis against *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, v. 189, p. 4951-4959, 2012.

FERNANDES, R. Microbiology handbook dairy products. Cambridge: Leatherhead Food International Ltd, 2009. 174p.

FREITAS, M.F.L.; LEÃO, A.E.D.S.; STAMFORD, T.L.M.; et al. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. B. CEPPA, v. 22, n. 2, p. 271-282, 2004.

GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M.; FONTES, P. R. Tecnologia de abate e tipificação de carcaças. Viçosa: UFV, 2006. 370p.

GÖTZ, F., BANNERMAN, T., SCHLEIFER, K.H. The genera *Staphylococcus* and *Macroccoccus*. In: Dworkin, M. (Ed.), *The Procaryotes*, vol. 4. Springer, New York, pp. 5–75. 2006.

HAAS, D.; POSCH, J.; SCHMIDT, S.; et al. *Aerobiologia*, v. 21, p. 193–201, 2005.

HENNEKINNE, J.-A.; GUILLIER, F.; PERELLE, S.; et al. 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.; et al. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins*, v. 2, n. 8, p. 2106-2116, 2010.

HINTON Jr., A., CASON, J.A.; INGRAM, K.D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, p. 155– 165, 2004.

HO, J.; O'DONOGHUE, M.M.; BOOST, M.V. Occupational exposure to raw meat: A newly-recognized risk factor for *Staphylococcus aureus* nasal colonization amongst food handlers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2013). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.009>>.

HU, C.; XIONG, N.; ZHANG, Y.; et al. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 419, p. 617–620, 2012.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D. A. Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens. *Annu. Rev. Med.*, v. 50, p. 223-236, 1999.

HUSEBY, M.; SHI, K.; BROW, C. K.; et al. Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 189, n. 23, p. 8719-8726, 2007.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6ª ed. São Paulo: Artmed, 2005.

KIM, S. J.; TANAKA, K. S. E.; DIETRICH, E.; et al. Locations of the Hydrophobic Side Chains of Lipoglycopeptides Bound to the Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, v. 52, p. 3405–3414, 2013.

KLEEMAN, K. T.; BANNERMAN, T. L.; KLOOS, W. E. Species Distribution of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates at a Community Hospital and Implications for Selection of Staphylococcal Identification Procedures. *Journal of clinical microbiology*, v. 31, n. 5, p. 1318-1321, 1993.

KOZACISNSKI, L.; FLECK, Z.C.; KOZACISNSKI, Z.; et al. Evaluation of shelf life of pre-packed cut poultry meat. *Vet. Arquiv.*, v. 82, n. 1, p. 47-58, 2012.

KUCHENBECKER, B. S.; RIBEIRO, A. R.; CARDOSO, M. Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 37, n. 2, 2009.

LATTAR, S. M.; LLANA, M. N.; DENOËL, P.; et al. Protein Antigens Increase the Protective Efficacy of a Capsule-Based Vaccine against *Staphylococcus aureus* in a Rat Model of Osteomyelitis. *Infect. Immun.*, vol. 82, n. 1, p. 83-91, 2014.

LIANG, X. J.; HALL, W.; YANG, J.; et al. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Hyperproduction of Alpha-Toxin in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, 2011.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.*, v. 189, p. 2334–2336, 2004.

LINHARES, I.; RAPOSO, T.; RODRIGUES, A.; et al. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000–2009). *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 19, 2013.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H.J.; LOVSETH, A.; et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 344–350, 2004.

LOPES, M.; GALHARDO, J.R.; OLIVEIRA, J.T.; et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina Universidade Estadual de Londrina*, v.28, n. 3, 2007.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; et al. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, p. 550–561, 2010.

MENEZES, L.D.M. Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MESRATI, I.; SAÏDANI, M.; ENNIGROU, S.; et al. Clinical isolates of Pantone-Valentine leucocidin and g-haemolysin producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. *Journal of Hospital Infection*, v. 75, p. 265-268, 2010.

MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. International Handbook of Foodborne Pathogens. Edição. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2003. 809 p.

MURRAY, P.R. Microbiologia Médica. Elsevier Brasil, 2006. 979 págs.

NAKAMURA, Y.; JON, O.; KEMP, B. C.; et al. *Staphylococcus* gama-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, v. 503, p. 397-404, 2013.

NATIONAL CHICKEN COUNCIL. Per Capita Consumption of Poultry and Livestock, 1965 to Estimated 2013, in Pounds. Disponível em <<http://www.nationalchickencouncil.org/about-the-industry/statistics/per-capita-consumption-of-poultry-and-livestock-1965-to-estimated-2012-in-pounds/>>. Acesso em: 09 de julho de 2013.

NECIDOVÁ, L.; JANŠTOVÁ, B.; KARPÍŠKOVÁ, R. Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. *Acta Vet. Brno*, v. 81, p. 391–396, 2012.

OGSTON, A. Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.*, v. 16, p. 52-66, 1882.

OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. *Brit. Med. J.*, v. 1, p. 369-375, 1881.

OLIVEIRA, T.C.R.M.; CUNHA, M.L.R.S.; HIROOKA, E.Y. Enterotoxinas Estafilocócicas. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.16, n. 1, p. 178-187, mar. 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, p. 20-25, 2007.

ONO, H.K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; et al. Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. *Infection and immunity*, v. 76, n. 11, p. 4999–5005, Nov. 2008.

ORENSTEIN, A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. Disponível em <<http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>>. Acesso em: 01 de julho de 2013.

ORTEGA, A. C. e BORGES, M. da S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 19, n. 1, p. 71-81, 2012.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; et al. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins*, v. 2, p. 2117-2131, 2010.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. *Publ. UEPG Biol. Health Sci.*, v.17, n.1, p. 37-45, 2011.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.

PORTO, E. Qualidade da carne: microbiologia de carnes Ed: Varela São Paulo-SP 2006.

RAJKOVIC, A.; EL MOUALIJ, B.; UYTTENDAELE, M.; et al. Immunoquantitative Real-Time PCR for Staphylococcus aureus Enterotoxin B in Detection and Quantification of Foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.72, nº 10, 2006.

RASOOLY, A.; RASOOLY, R.S. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, p. 205–212, 1998.

ROÇA, R.O. Tecnologia da carne e produtos derivados. 2.ed. Botucatu: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial/FCA/UNESP, 2001. 201p.

RODRIGUEZ-CATURLA, M.Y.; VALERO DIAZ, A.; VALLEJO, J.L.R.; et al. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. *Meat Science*, v. 92, nº. 4, p. 409-416, 2012.

ROSA, C.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. HIROOKA, E.Y. Enterotoxina Estafilocócica para Produção de Padrão e Eliminação de Interferentes Alimentares no Método de RPLA. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.20, n. 1, p. 71-78, mar. 1999.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.77, p. 61-70, 2002.

ROSENBACH, AJ. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, J.F. Bergmann, 1884. p. 18

SANTILIANO, F.C.; ALMEIDA, B.R.; IGNACCHITI, M.D.C.; et al. 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.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 11, p. 1-20, 1990.

SCHNEEWIND, O.; MODEL, P.; FISCHETTI, V. A. Sorting of Protein A to the Staphylococcal Cell Wall. *Cell*, v. 70, p. 267-261, 1992.

SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R.; et al. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *International Journal of Food Microbiology*, v. 10, p. 33-42, 1990.

SCOPEL, M.; ABRAHAM, W.-R.; ANTUNES, A. L.; et al. Mevalonolactone: An Inhibitor of Staphylococcus Epidermidis Adherence and Biofilm Formation. *Medicinal Chemistry*, v. 10, p. 246-251, 2014.

SILVA Jr, E. A. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 6<sup>a</sup> ed, São Paulo: Varela, 2007.

SUBATHRA, D. C. ; SINHA, D. ; SHARMA, V. ; et al. Screening for staphylokinase producing Staphylococcus spp. from different environmental samples. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 5, n. 4, p. 125 -128, 2012.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar: VEDTHA. Ministério da Saúde, Brasil, 2011. 103 págs.

TÜRKYILMAZ, S.; KAYA, O. Determination of some Virulence Factors in Staphylococcus Spp. Isolated from Various Clinical Samples. *Turk J Vet Anim Sci*, v. 30, p. 127-132, 2006.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2013. 57 págs.

VALERO, A., PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; et al. Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, v. 133, p. 186–194, 2009.

VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550)>. Acesso em: 12 de outubro de 2012.

WATERS, A. E.; CONTENTE-CUOMO, T.; BUCHHAGEN, J.; et al. Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, n° 10, págs. 1227–1230, 2011.

WHITE, C. A.; HALL, L. P. The effect of temperature abuse on *Staphylococcus aureus* and *Salmonellae* in raw beef and chicken substrates during frozen storage. *Food Microbiology*, v. 1, p. 29-38, 1983.

WIENEKE, A. A. Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, v. 14, p. 305 – 312, 1979.

WIENEKE, A. A. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. *J. Hyg., Cambridge*, vol. 73, pág.255-162, 1974.

YOLKEN, R. H.; STOPA, P.J. Enzyme-Linked Fluorescence Assay: Ultrasensitive Solid- Phase Assay for Detection of Human Rotavirus. *J. Clin. Microbiol*, v. 10, n. 3, p. 317-321, 1979.