

MARCUS VINÍCIUS COUTINHO COSSI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UNIDADES
ANALÍTICAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS PARA
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE
HIGIENE E DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. E *Escherichia coli***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

MARCUS VINÍCIUS COUTINHO COSSI

**AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE COLETA DE
AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO PARA ENUMERAÇÃO
DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE E
DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. E *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO: 11 de fevereiro de 2011

José Paes de Almeida Nogueira Pinto
UNESP-Botucatu

Luciano dos Santos Bersot
UFPR-Palotina

Paulo Sérgio de Arruda Pinto
Co-orientador
UFV

Luís Augusto Nero
Orientador
UFV

"A vida só pode ser comprendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para a frente."

Soren Kierkegaard

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pois sem ele nada disso seria possível. Agradeço de todo coração também a minha Família, meu pai Junão e minha mãe Hosana que durante toda a caminhada estiveram ao meu lado, com conselhos, carinho, amor, ajudando a ultrapassar os obstáculos quando necessário e dividindo a alegria dos bons momentos. Agradeço de todo o coração também a meu irmão Magnus que estando bem próximo pode observar o dia a dia desse trabalho tendo que agüentar o estresse de alguns dias, por esses dias peço minhas sinceras desculpas e por todos os outros o meu muito obrigado. Obrigado também a todos os familiares pela energia positiva durante todo esse caminho. Muito obrigado a minha namorada Iara que tem me ajudado muito nessa reta final, obrigado por toda sua compreensão e companheirismo. Obrigado também ao meu orientador Prof. Nero que durante esses dois anos me ajudou muito para que tudo saísse da melhor forma possível. Meu obrigado muito especial também a todos que ajudaram diretamente a realização desse projeto, Michelle, Mariane, Marcelo e Jorge, pois sem vocês tudo teria sido bem mais difícil. Obrigado aos companheiros de mestrado Lukinha, Japa, Bruna, Luana, Paulinha e Newton. Por ultimo e não menos importante o meu muito obrigado a todos os Grandes Amigos de Viçosa e Mococa que indiretamente me ajudaram a concluir mais essa etapa. Obrigado a Fapemig, CNPq, UFV e Departamento de Medicina Veterinária. Obrigado a todos.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	ixi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Importância econômica da carne de frango.....	3
2. Programas de controle de qualidade e segurança.....	4
3. Características microbiológicas de carne de frango.....	7
4. Análises microbiológicas e técnicas de amostragem de carcaças de frango	10
Referências	16
OBJETIVOS	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos.....	24
Artigo 1. <i>Salmonella</i> spp. e qualidade microbiológica de carcaças de frango resfriadas ‘in natura’, submetidas e não submetidas a fiscalização oficial no Brasil.....	25
Resumo	26
Abstract	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Coleta de amostras e diluições.....	29
Pesquisa de indicadores de higiene.....	30
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	30
Análise dos dados	31
Resultados e Discussão	32
Referencias bibliográficas.	39
Artigo 2. Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas para obtenção de unidade analítica em carcaças de frango para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene.....	44
Resumo.....	45
Abstract	46
Introdução.....	47

Material e Métodos.....	48
Coleta de carcaças de frango	48
Procedimentos de amostragem das carcaças de frango e diluições	48
Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene	51
Análise dos dados	51
Resultados e Discussão	52
Referências	63
Artigo 3. Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas de coleta de amostras em carcaças de frango para detecção de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp... 67	
Resumo	68
Introdução.....	70
Material e Métodos.....	71
Coleta de carcaças de frango	71
Procedimentos de amostragem das carcaças de frango e diluições	71
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	73
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	73
Análise dos dados	75
Resultados e Discussão	75
Referências	80
CONCLUSÕES	85
RESULTADOS DETALHADOS	86

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Previsão da produção brasileira de carne bovina; suína e frango (Brasil, 2006).
.....4
- Figura 2. Previsão da produção mundial de carne bovina, suína e frango (Brasil, 2006).4

ARTIGO 1

- Figura 1. Produtos de reações de PCR com primers para detecção dos genes *invA* e *ompC* separado em gel de agarose obtido por eletroforese horizontal, corados por GelRed e observados em transiluminador. M: Marcador de peso molecular (100 a 1000 pb), P: controle positivo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); N: controle negativo (água milli-Q), C1 e C2: culturas testadas.....35

ARTIGO 2

- Figura 1. Visão Frontal (A) e Dorsal (B) de uma carcaça típica de frango, demonstrando a divisão da carcaça em duas metades (linha pontilhada marcando o meio da carcaça). Em uma das metades da carcaça foi utilizado o método lavagem superficial. A outra metade foi dividida em 6 áreas (quadrados pontilhados) e foram amostrados por excisão de tecido, excisão de pele e esfregaço superficial de pele. Os quadrados enumerados de 1, 2, 4 e 5 foram considerados distantes da cloaca e os quadrados 3 e 6 foram considerados próximos a cloaca.50

ARTIGO 3

- Figura 1. Visão Frontal (A) e Dorsal (B) de uma carcaça típica de frango, demonstrando a divisão da carcaça em duas metades (linha pontilhada marcando o meio da carcaça). Em uma das metades da carcaça foi utilizado o método lavagem superficial. A outra metade foi dividida em 6 áreas (quadrados pontilhados) e foram amostrados por excisão de tecido, excisão de pele e esfregaço superficial de pele. Os quadrados enumerados de 1, 2, 4 e 5 foram considerados distantes da cloaca e os quadrados 3 e 6 foram considerados próximos a cloaca.72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Quadro 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de amostragens mais comuns utilizados para enumeração de micro-organismos de superfícies de carcaças cárneas (Capita et al., 2004). 13
- Quadro 2. Trabalhos de avaliação de procedimentos de amostragem de carcaças animais, considerando diferentes grupos de micro-organismos pesquisados..... 15

ARTIGO 1

- Tabela 1: Parâmetros estatísticos de contaminação (log UFC/g) por micro-organismos indicadores de higiene em amostras de carcaças de frango resfriadas, submetidas ou não a inspeção oficial..... 33
- Tabela 2. Frequência de resultados positivos para *E. coli* (≥ 2.0 log UFC/g) e *Salmonella* em frangos resfriados submetidos ou não a fiscalização oficial..... 36
- Tabela 3. Frequências de amostras de carcaças de frango inspecionadas ou não inspecionadas considerando diferentes níveis de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene. 37

ARTIGO 2

- Quadro 1. Relação entre técnicas de coleta de amostras e suas respectivas áreas, volume de diluentes e concentração final. 51
- Tabela 1. Parâmetros estatísticos de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango frescas obtidas por diferentes técnicas de amostragem. 54
- Tabela 2. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens por micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango resfriadas obtidas por diferentes técnicas de amostragem. 55
- Tabela 3. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango e obtidas próximas ou não a região cloacal por diferentes técnicas de amostragem..... 58
- Tabela 4. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango e obtidas por diferentes técnicas de amostragem e próximas ou não a região cloacal. 59

Tabela 5. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de aeróbios mesófilos em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem.....	61
Tabela 6. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de Enterobacteriaceae em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem.....	61
Tabela 7. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de coliformes totais em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem.....	62
Tabela 8. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de <i>Escherichia coli</i> em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem.....	62

ARTIGO 3

Tabela 1. Frequências de resultados positivos para <i>E. coli</i> (contagem igual ou superior a 100 ufc/cm ² ou g) e <i>Salmonella</i> , por técnica de amostragem e independente de técnica de amostragem.	76
Tabela 2. Teste McNemar para presença/ausência de <i>E. coli</i> (quantidade mínima de 100 UFC por cm ² ou g).....	78
Tabela 3. Teste McNemar para presença/ausência de <i>Salmonella</i> (quantidade mínima de 1 <i>Salmonella</i> por 25 cm ² ou g.)	78
Tabela 4. Comparação entre locais de amostragem na carcaça, considerando métodos de amostragem, considerando presença de <i>E. coli</i> (10 ou 100 UFC/cm ² ou g) e <i>Salmonella spp</i> (1 <i>Salmonella</i> /25 cm ² ou g).....	80

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 1. Resultados detalhados das contagens de aeróbios mesófilos pelas quatro técnicas de coleta de amostras.	87
Tabela 2. Resultados detalhados das contagens de Enterobactérias pelas quatro técnicas de coleta de amostras.	89
Tabela 3. Resultados detalhados das contagens de Coliformes totais pelas quatro técnicas de coleta de amostras.	91
Tabela 4. Resultados detalhados das contagens de <i>Escherichia coli</i> pelas quatro técnicas de coleta de amostras.	93
Tabela 5. Resultados detalhados das detecções de <i>Salmonella spp.</i> pelas quatro técnicas de coleta de amostras.	95

RESUMO

COSSI, Marcus Vinícius Coutinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Avaliação de métodos de obtenção de unidades analíticas de carcaças de frango resfriadas para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene e detecção de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientadores: Paulo Sérgio de Arruda Pinto e Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

A crescente evolução da produção de carne de frango no Brasil determina a necessidade de adequação a diversos mercados consumidores, cada vez mais exigentes quanto a aspectos de qualidade higiênica e segurança alimentar. Nesse sentido, o monitoramento microbiológico é um fator determinante para a garantia da qualidade e inocuidade dos produtos avícolas, e a coleta de amostras é uma etapa crucial para essa caracterização. Diversas metodologias de amostragem podem ser aplicadas em aves, e são classificadas em destrutivas e não destrutivas, com vantagens e desvantagens compatíveis com a realidade de produção de cada indústria ou país. O presente trabalho teve como objetivos comparar a qualidade e segurança microbiológica de carcaças de frango inspecionadas e não inspecionadas, e avaliar quatro procedimentos de amostragem de carcaças de frango para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene e detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. 60 carcaças de frango resfriadas foram obtidas em pontos comerciais da região de Viçosa, MG, sendo 30 submetidas a algum tipo de inspeção oficial e 30 não inspecionadas. Em condições assépticas, todas as carcaças foram submetidas à coleta de amostras por quatro procedimentos diferentes (excisão de tecido, excisão de pele, lavagem superficial e swab de carcaça, sempre considerando regiões próximas e distantes da cloaca), e submetidas a pesquisa de *Salmonella* spp. e enumeração de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos foram comparados para verificação de diferenças significativas (ANOVA, Kruskal Wallis, e McNemar, $P < 0,05$) considerando a fiscalização ou não das amostras, além dos procedimentos de amostragem. Ainda, os dados foram correlacionados (Spearman) para verificação de equivalências entre os procedimentos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as contagens de micro-organismos indicadores de higiene e presença de *Salmonella* spp. nas carcaças de frango inspecionadas e não inspecionadas ($P > 0,05$). Em relação aos procedimentos de amostragem, excisão de tecidos foi a que permitiu maior recuperação de micro-organismos indicadores de higiene, e foram observadas ausência de diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os níveis de

contaminação de amostras coletadas próximas e distantes da cloaca. A maioria dos procedimentos de amostragem apresentou correlação significativa entre si, exceto para enumeração de *E. coli* por excisão de pele e tecido. Para detecção de *E. coli*, swab de pele foi o procedimento que obteve estatisticamente a mais baixa frequência de resultados positivos. Não houve diferenças significativas entre os procedimentos de amostragem testados para detecção de *Salmonella* spp. Também não foram observadas diferenças significativas entre amostras coletadas próximas ou distantes da região da cloaca. Apesar da ausência de diferenças entre as contagens e presença de microorganismos em carcaças inspecionadas e não inspecionadas, é importante ressaltar a importância da fiscalização oficial de produtos de origem animal, que abrange ainda aspectos relacionados a resíduos químicos e sanidade animal. Considerando os resultados de procedimentos de amostragem, os dados obtidos indicam a equivalência entre algumas técnicas, viabilizando a sua utilização pela indústria e órgãos oficiais de acordo com os objetivos de qualidade e segurança alimentar pretendidos.

ABSTRACT

COSSE, Marcus Vinícius Coutinho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february of 2011. **Evaluation of sampling procedures of refrigerated chicken carcasses for enumeration of hygiene indicators microorganisms and detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisors: Paulo Sérgio de Arruda Pinto and Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

The growing evolution of chicken meat production in Brazil determines the need of adequacy of several international markets, which demands hygienic quality and microbiological safety. Concerning this, the microbiological monitoring is a determinant factor for assure quality and safety of the avian food products, being the sampling procedure a key step for the reliability of this characterization. Several sampling procedures can be used for bird carcasses, and they are classified as destructive and non-destructive. Both types of procedures has advantages and disadvantages according the production reality of food industries and countries. The goals of the present work was to compare the microbiological quality and safety of chicken carcasses produced and not produced under official inspection, and evaluate four sampling procedures of chicken carcasses for enumeration of hygiene indicators microorganisms and detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. 60 fresh chicken carcasses were collected in the Viçosa city region, MG (30 was inspected and 30 was not inspected). In aseptic conditions, all carcasses were submitted to the following sampling procedures: tissue excision, skin excision, skin swab and rinsing. Then, all samples were submitted to the microbiological analysis for *Salmonella* spp. detection and enumeration of mesophilic aerobes, Enterobacteriaceae, total coliforms and *E. coli*. All samples were collected considering regions near and far from the cloacae region. The obtained results were compared to verify significant differences (ANOVA, Kruskal Wallis, and McNemar, $P < 0,05$) considering the inspection service, and sampling procedures. The data were also analyzed to verify the equivalence between then (Spearman). The mean counts of indicator microorganisms and frequency of positive results for *Salmonella* spp. did not present significant differences ($p > 0.05$) considering whether samples inspected or not. Tissue excision allowed the greatest recovery of hygiene indicator microorganisms, being significantly higher than all other techniques for total coliforms and *E. coli* ($P < 0.05$). No significant differences were observed between samples collected close to or far from the cloacae region ($P > 0.05$). Based on our results, we identified significant correlations ($P < 0.05$) between all sampling

techniques evaluated for most of the hygiene indicators assayed (with the exception of *E. coli* in relation to skin excision and tissue excision). For *E. coli* detection, skin swab was the procedure that result the lowest frequency of positive results. For *Salmonella* spp. was observed absence of significant differences between the tested procedures. Also, no significant differences were observed between samples collected near and far from cloacae. Despite the similarities of the microbiological profile of samples submitted or not to official inspection, it is important stress the relevance of the official fiscalization service of animal origin products, once it consider other aspects of food production like chemical residues and animal health. Considering the results of sampling procedures, the obtained data indicate the equivalence between some of them, leading food inspectors and industries to choose the most adequate method for the microbiological quality and safety goals desired.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o primeiro em exportações. Projeções sugerem ainda que até 2017 a produção, exportação e consumo desse produto no Brasil terão um crescimento superior aos demais países. Essa evolução determinou o desenvolvimento de programas de controle de qualidade, visando o monitoramento de riscos para saúde pública relacionados ao consumo desse produto. Em relação a carcaças de frango, dois programas oficiais se destacam no Brasil: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF (do Ministério da Saúde, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA), e o Programa de Redução de Patógenos e Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus - PRP (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

O PREBAF tem como objetivo a determinação da prevalência e caracterização dos sorovares do gênero *Salmonella* spp. em carne de frango expostas ao consumo humano, enquanto o PRP o constante monitoramento microbiológico na no abate para detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frango e de peru. O que esses programas têm em comum é a análise sistemática da qualidade e segurança da carne de frango pela detecção de patógenos. A importância da carne de frango em relação a possíveis perigos microbiológicos e conseqüente relação com a saúde pública e os mercados consumidores também determinou a elaboração de legislações e padrões específicos para esses produtos e seus derivados. Alguns países, como os pertencentes a Comunidade Européia, determinam ausência de *Salmonella* spp. em 25g de produtos destinados ao consumo humano como garantia de segurança e qualidade. No Brasil, por exigência da ANVISA, o controle é realizado pela contagem de micro-organismos indicadores de higiene, especificamente coliformes a 45° C, que não podem estar presentes em contagens superiores a 4.0 logUFC/g. Nos Estados Unidos, o controle é realizado de forma sistemática na indústria, controlando-se *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Em comum, todos os países que realizam um controle efetivo na produção de carne de frango propõem a pesquisa de indicadores da presença de patógenos, ou o principal patógeno associado a esse produto, neste caso, *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um dos patógenos mais associados a toxinfecções alimentares relacionadas ao consumo de produtos a base de frango. Devido a sua relevância em

saúde pública, e associação direta com esses produtos, seu monitoramento durante a produção é importante para garantia da segurança alimentar. Entretanto, devido a dificuldade inerente a metodologia de isolamento e demora na obtenção de resultados finais, outros micro-organismos podem ser pesquisados paralelamente como indicadores de sua presença, além de condições higiênicas de produção. Nesse contexto, aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* são usualmente pesquisados em programas de controle de qualidade na produção de carcaças de frango.

Independente do patógeno ou grupo de micro-organismo indicador pesquisado, uma etapa crucial para a realização de análises microbiológicas em carcaças de frango é a amostragem. Existem diversos protocolos utilizados para a realização dessa etapa, que pode ser classificada em métodos destrutivos e não destrutivos. Todos estes métodos possuem vantagens e desvantagens na sua utilização, quanto ao tempo de coleta de amostra, representatividade da contaminação total do produto e disponibilidade de material e mão de obra, sendo a escolha da melhor opção dependente dos objetivos desejados pela pesquisa ou monitoramento. Assim, estudos avaliando a viabilidade e equivalência entre essas metodologias são importantes referências para programas de controle de qualidade em carcaças de frango.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Importância econômica da carne de frango

A produção brasileira de carne de frango em 2010 é estimada em 11,4 milhões de toneladas, representando a terceira maior mundial, posição que o país ocupa desde 2003. Devido a esse potencial, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, com 3,3 milhões de toneladas destinadas ao mercado externo e superando o maior produtor mundial neste quesito, os Estados Unidos da América (EUA). Outro fator que favorece essa atividade é o grande mercado consumidor brasileiro, composto por 190 milhões de habitantes com um consumo “per capita” de aproximadamente 36 kg de carne de frango por ano (ABEF, 2010).

Segundo Projeções do Agronegócio para o período entre 2006 e 2017, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2006), a carne de frango é a que apresenta a maior taxa de crescimento de produção quando comparada com a carne bovina e suína. Segundo essa projeção, a produção de carne de frango terá uma taxa de crescimento no período de 2005/06 a 2016/17 de 4,1% ao ano, enquanto carne bovina terá 2,5% e a carne suína de 2,1% (Figura 1). Entretanto, as produções de todos esses tipos de carnes apresentarão um desenvolvimento superior às previsões de crescimento mundial (Figura 2). Quanto às exportações de carne de frango, segundo o “United States Department of Agriculture” (USDA), o Brasil ainda será o maior exportador mundial em 2015, seguido pelo EUA, União Européia e Tailândia. A preferência pelo consumo da carne de frango também seguirá a mesma tendência da produção e da exportação, sendo que esse produto provavelmente será a primeira opção entre os consumidores brasileiros, com um crescimento projetado de 2,6% ao ano (Brasil, 2006).

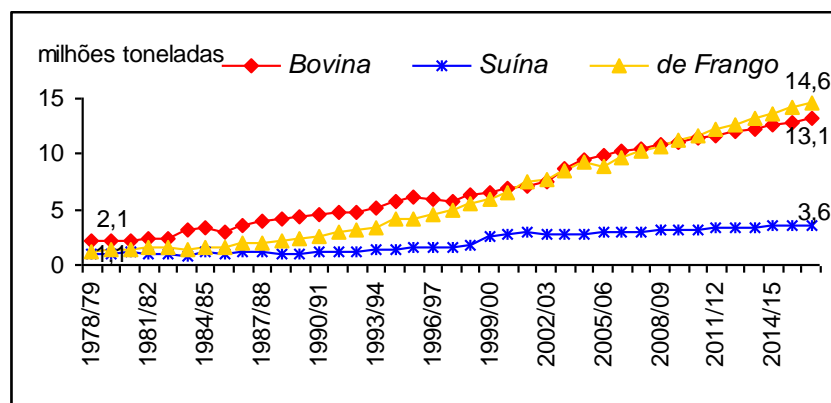


Figura 1. Previsão da produção brasileira de carne bovina; suína e frango (Brasil, 2006).

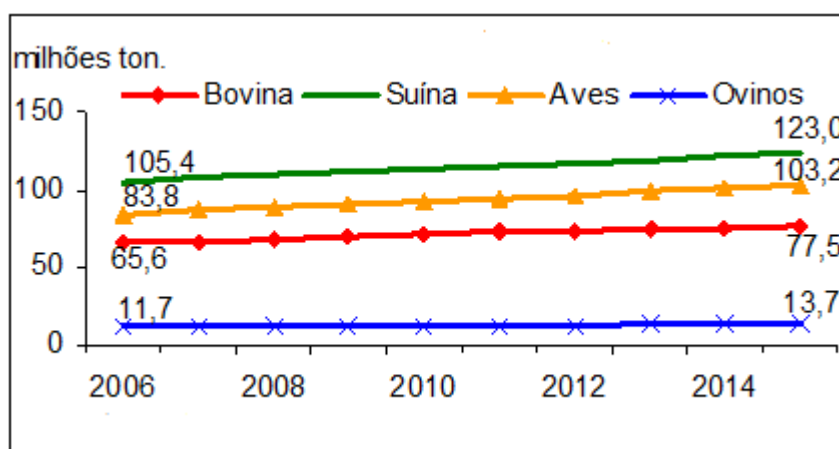


Figura 2. Previsão da produção mundial de carne bovina, suína e frango (Brasil, 2006).

2. Programas de controle de qualidade e segurança

O crescimento da produção e consumo da carne de frango e as transformações dos hábitos alimentares nos mercados consumidores foram acompanhados de um grande desenvolvimento nos programas de controle de qualidade desse produto. Em complementação, a tradicional inspeção visual desses produtos não é suficiente para garantir aos consumidores a ausência ou minimização de riscos microbiológicos (Hutchison et al., 2005; Capita et al., 2004). Nesse sentido, as indústrias têm investido uma grande parte de seus recursos no desenvolvimento de programas de qualidade que assegurem a qualidade higiênica de seus produtos. Isso se deve principalmente as grandes perdas econômicas causadas pelo aparecimento de casos e surtos de toxinfecções alimentares nos consumidores, causados por ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos (Tsola et al. 2008).

Vários programas de controle de qualidade e segurança são aplicados pelas indústrias de alimentos há vários anos. Como exemplos podem ser citados programas e sistemas como Procedimentos Higiênicos Operacionais Padrão (PPHO ou SSOP), Boas Práticas de Fabricação (BPF ou GMP) (Brasil, 1997), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP) (Brasil, 1998), que vêm sendo aplicados na produção de carne de aves em diversos países. Esses programas de controle, principalmente o APPCC, permitem que os riscos de contaminação sejam monitorados. Com esses resultados, é possível sugerir ações corretivas na linha de abate. Para a efetiva aplicação desses programas, a principal ferramenta é a análise sistemática de contaminações microbiológicas, não apenas indicada pela presença do patógeno, mas também pelas contagens de micro-organismos que indicam qualidade higiênica da carcaça (Zweifel et al., 2005; Palumbo et al., 1999). O APPCC é um programa mundialmente utilizado, cuja função é a análise sistemática de todos os estágios da linha de produção de alimentos, na identificação, avaliação e controle dos riscos (Tsola et al., 2008).

Especificamente no Brasil, dois importantes programas foram desenvolvidos por órgãos oficiais: o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência, Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (Brasil, 2008), e o Programa de Redução de Patógenos e Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus (PRP), coordenado pelo MAPA (Brasil, 2003a). Enquanto o PREBAF teve como objetivo o controle e monitoramento de patógenos em carcaças de frango disponíveis em pontos comerciais aos consumidores, o PRP determinou uma abrangente e sistemática análise laboratorial de carcaças de frangos e perus "in natura" para pesquisa de *Salmonella* spp., envolvendo todos os estabelecimentos de abate de aves registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

O PREBAF (Brasil, 2008) surgiu como resultado das discussões do Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, instituído pela ANVISA através da Resolução-RDC nº 5 de 2000 (Brasil, 2000). Além dele, outro programa elaborado por este grupo de trabalho que se destaca é o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVET, iniciado em 2002. O PREBAF foi elaborado considerando a ausência da pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frango e seus derivados pela Resolução-RDC nº 12 (Brasil, 2001a), que tem por justificativa as limitações tecnológicas que

impedem a eliminação total deste patógenos nesses produtos. Assim, surgiu a necessidade de se criar um programa nacional capaz de determinar a prevalência e a caracterização de sorovares do gênero *Salmonella* spp. presentes na carne de frango, fornecendo subsídios para futuras opções de gerenciamento dos possíveis riscos microbiológicos.

Considerando a ausência de controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frango, a ANVISA também aprovou a Resolução-RDC nº 13 (Brasil, 2001b), que exigiu que fossem inseridos nos rótulos das carnes de aves informações aos consumidores sobre as formas adequadas para uso, preparo e conservação desse produto (Brasil, 2008). Neste contexto, o PREBAF foi desenvolvido visando a determinação da prevalência e quantificação de sorovares do gênero *Salmonella* em carne de frango exposta ao consumo humano, assim como também a verificação do cumprimento das disposições constantes na Resolução-RDC nº 13 (Brasil, 2001b).

O PREBAF foi executado entre agosto de 2004 e julho de 2006, em 13 Estados e no Distrito federal, cobrindo as cinco grandes regiões do Brasil e 83% da produção brasileira de carcaças de frango. O programa encontrou uma frequência de 3% de amostras positivas para *Salmonella* spp. em amostras de frango congeladas. Apesar de ser observada uma frequência baixa, a presença desse patógeno em alimentos representa um fator de risco para a saúde humana. *S. Enteritidis* foi o sorovar encontrado com maior frequência, confirmando dados de pesquisas nacionais e internacionais que o descrevem como principal causador de enfermidades em humanos associado ao consumo de aves e derivados (Brasil, 2008).

O PRP foi desenvolvido considerando que o sistema de inspeção é realizado em conjunto com as práticas de garantia da qualidade e segurança, como BPF, PPHO e APPCC, determinando um controle minucioso das diversas fontes de contaminação possíveis durante o processamento da carne de frangos. Esses procedimentos têm por objetivo a redução dos riscos da ocorrência de perigos físicos, químicos e biológicos, visando à segurança dos alimentos produzidos, mediante o controle do sistema de produção. Dessa forma, o PRP teve como objetivo o monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus (Brasil, 2003a). Entretanto, até o momento o MAPA não divulgou nenhum resultado da prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango nas indústrias nacionais.

Independente do programa considerado, a principal forma de se controlar a qualidade e segurança de carne de frango ocorre pelo monitoramento de micro-

organismos indicadores de higiene e patogênicos em diferentes etapas da produção e nos produtos finais (Hutchison et al., 2006; Brown et al. 2000). Essas análises microbiológicas são utilizadas em ações rotineiras de controle (monitoramento) e nas verificações do funcionamento do sistema (auditorias), vinculadas aos princípios dos sistemas modernos de controle de qualidade de alimentos.

Os riscos para a saúde pública relacionados à ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. levou ao estabelecimento de padrões de qualidade, que são muitas vezes específicos para cada país e que levam em consideração não apenas a identificação do patógeno, mas também a contagem de micro-organismos indicadores que podem sugerir condições inadequadas de processamento e assim, possível presença desse patógeno. No Brasil o único padrão oficial exigido para carne de frango é a contagem de coliformes a 45 °C em produtos destinados ao consumo humano e disponível em pontos comerciais, que não deve ser superior a 4.0 log UFC/g (Brasil, 2001a). A legislação européia prevê apenas a pesquisa de *Salmonella* spp. em produtos destinados diretamente ao consumidor, que deve estar ausente em 25g de amostra analisada (EC, 2007). Nos EUA o controle sanitário de carcaças de frango deve ser realizado nas indústrias, com planos de amostragem definidos e parâmetros específicos para *Escherichia coli* (2.0 a 3.0 log UFC/g) e *Salmonella* spp. (ausência em 20% das análises) (USA, 2003). Esses diversos parâmetros evidenciam a preocupação de diferentes países em garantir a segurança microbiológica de carcaças de frango, seja pela pesquisa direta de *Salmonella* spp. ou pela pesquisa de micro-organismos que indicam a sua presença. De qualquer forma, o monitoramento microbiológico possui importância fundamental para a garantia dessa segurança, sendo indispensável para o controle de qualidade em indústrias de processamento de aves e órgãos oficiais de controle, como a ANVISA e MAPA no Brasil.

3. Características microbiológicas de carne de frango

O monitoramento dos processos industriais de produção de carne de frango usualmente utiliza como parâmetros a pesquisa de *Salmonella* spp. e enumeração de vários grupos de micro-organismos indicadores como, aeróbios mesófilos, coliformes, e *Escherichia coli* (Alvarez-Astorga et al. 2002). A pesquisa de indicadores é importante, pois esses micro-organismos fornecem informações valiosas sobre as condições higiênicas de produção, além de sugerir a presença de patógenos. A contaminação microbiológica de carcaças de frangos durante o abate e processamento industrial pode

ocorrer devido a vários fatores, como o contato com equipamentos, utensílios, instalações e manipuladores, bem como entre as próprias carcaças, além de falhas durante o processo, como a ruptura de alças intestinais. Dessa forma a tradicional inspeção visual muitas vezes não é suficiente para garantir a qualidade dessas carcaças e por isso várias alternativas de procedimento e monitoramento devem ser consideradas durante o processo industrial, procurando-se evitar ou minimizar essas contaminações (Capita et al., 2004).

Nesse sentido, a análise microbiológica de carcaças de frango durante diferentes fases do abate é fundamental para o monitoramento adequado de sua qualidade e segurança alimentar, orientando a aplicação de ações corretivas (Gill et al., 2005). Muitos dos micro-organismos pesquisados, pela facilidade com que são identificados, são indicadores de condições higiênicas durante a obtenção e processamento, além de poderem sugerir a presença de patógenos (Ghafir et al., 2008). Esse monitoramento sistemático de frangos em diferentes fases do abate ainda é uma exigência em vários países produtores, exportadores e importadores.

Especificamente em aves, a microbiota se encontra essencialmente na superfície externa (penas, espaço interdigital e tegumentos cutâneos), no trato digestivo e, em menor grau, no trato respiratório (Reiter et al., 2007; Almeida & Silva, 1992). As aves chegam aos abatedouros com bactérias firmemente aderidas a pele (Rasschaert et al., 2007; Lillard, 1989) e estas, inclusive *Salmonella* spp., não são facilmente removidas por um único lavagem superficial com água ou diversas outras soluções sanitizantes (Lillard, 1989; Lillard, 1988). Durante o abate, a água do tanque de escaldamento atua disseminando micro-organismos da pele e tegumentos cutâneos para outras partes da carcaça, principalmente pulmões (Reiter et al., 2007; Schneider, 1973). Embora a temperatura da água de escaldamento tenha ação antimicrobiana, quando é aquecida entre 52 °C e 60 °C micro-organismos da família Enterobacteriaceae, inclusive *Salmonella* spp., podem persistir e até mesmo se multiplicar (Reiter et al., 2007; Lahellec & Colin, 1984).

Os níveis de contaminação microbiológica em carcaças de frango são reduzidos progressivamente durante as operações de abate e evidenciam etapas como a depenação e evisceração como pontos críticos de contaminação, principalmente para as bactérias presentes no trato digestivo (Reiter et al., 2007; Almeida & Silva, 1992). Outro ponto de contaminação importante é o tanque de resfriamento, que participa ativamente na contaminação cruzada das carcaças (Rasschaert et al., 2007). Ao sair desses tanques, a

carga microbiana das carcaças é influenciada pelo nível de contaminação inicial das mesmas antes do resfriamento, da vazão da água e da relação de aves por volume de água (Carvalho et al., 2002). Segundo Lillard (1990), a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças é sempre maior após o resfriamento com água fria. Segundo o Serviço de Inspeção Federal dos Estados Unidos (“Food Safety and Inspection Service”), o número de carcaças contaminadas por *Salmonella* spp. aumenta de 5 para 36%, antes e após resfriamento, respectivamente (Lillard, 1990).

A presença de patógenos em carcaças de frango pode ser originada de várias fontes de contaminação, como fezes de animais (sadios ou doentes), manipulação inadequada e o próprio ambiente de abate e processamento (Jay et al., 2005). Nessas condições, patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni*, entre outros, podem atingir as carcaças de frango e se manterem viáveis até momentos antes do consumo. Ainda, alguns desses patógenos conseguem se desenvolver durante a conservação sob refrigeração, o que aumenta a preocupação com os referidos perigos e as fases de abate (Cason et al., 2004; Borch et al., 1996). Embora vários patógenos possam ser isolados de carne de frango e seus derivados, *Salmonella* spp. é considerado como o principal patógeno associado a esse produto (Cox et al., 2010; Altekruuse et al., 2006).

Salmonella spp. é patogênica para os humanos, podendo causar doenças agudas ou crônicas. As doenças agudas incluem diarreia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos, febre e em casos de pessoas imunodeprimidas pode levar a morte (Dominguez & Schaffner, 2009; Jay et al., 2005). As doenças crônicas incluem artrites, miocardite, pericardite e Síndrome Guillian-Barre (Kotula & Pandya, 1995). Muitos casos e surtos de toxinfecções alimentares tem sido associados a ingestão de carne de frango e seus derivados. (Cox et al., 2010; Freitas et al., 2010; Dominguez & Schaffner, 2009; Altekruuse et al., 2006). Na Inglaterra e País de Gales, a carne de frango foi responsável por surtos e casos esporádicos (Rampling et al., 1989) e por aproximadamente 30.000 casos/ano de toxinfecções alimentares em seres humanos (Ward & Threlfall, 1997). Na Itália, entre 1991 e 1994 *Salmonella* spp. foi responsável por 81% dos 1.699 surtos de origem alimentar, dos quais 34% foram causados por *Salmonella* Enteritidis (Scuderi et al., 1996). Nos EUA, é estimado que a cada ano 1,4 milhões de pessoas são acometidas por salmonelose, levando a aproximadamente 14.800 hospitalizações e 415 mortes (Smith et al. 2008). Na Nova Zelândia, apesar dos casos de salmoneloses terem diminuído de 2.417 em 2001 para 1.278 em 2006,

Salmonella spp. ainda é o segundo patógeno mais associado a toxinfecções alimentares no país (Chrystal et al., 2008). No Brasil, Tavechio et al. (1996) reportaram um aumento do isolamento de *Salmonella* Enteritidis a partir de 1993, e recentemente a ANVISA divulgou os resultados do PREBAF que mostram a prevalência de 3% de *Salmonella* spp. em carcaças de frango (Brasil, 2008). Os resultados do PRP ainda não foram oficialmente divulgados.

Devido a importância desse patógeno, *Salmonella* spp. é usualmente considerada como uma referência importante em programas de controle de qualidade e segurança em indústrias de processamento de carne de frango (Dominguez & Schaffner, 2009; Jay et al., 2005). Além disso, esse patógeno ocorre com uma frequência suficiente em carne de frango que permite que seja detectado e monitorado na linha de produção, direcionando a aplicação de intervenções para evitar a contaminação (Muth et al., 2009; Eblen et al., 2006). Assim, a indústria de alimentos e órgãos oficiais de controle necessitam de análises confiáveis, práticas e rápidas para detecção de *Salmonella* spp. em aves (Muth et al., 2009). A aplicação de testes com essas características é um reflexo da atual necessidade de um rígido controle de qualidade e pressão de mercado, que se apresenta cada vez mais exigente em diferentes aspectos, como volume, qualidade e segurança (Eblen et al., 2006).

4. Análises microbiológicas e técnicas de amostragem de carcaças de frango

Alguns grupos de micro-organismos são usados para avaliar a qualidade e segurança microbiológica da carne de frango. Quando presentes indicam uma possível presença de patógenos e ou micro-organismos deterioradores, indicando, portanto a falha na qualidade de higiene do processamento, dos operadores, das instalações ou da produção primária (Ghafir et al., 2008; Rodrigues et al., 2008). Atualmente várias metodologias alternativas podem ser utilizadas para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene em alimentos, e nas diferentes etapas de produção, em substituição às metodologias microbiológicas convencionais (Fung, 2002). Principalmente para a enumeração de micro-organismos indicadores, o princípio da maioria dessas metodologias alternativas é similar às metodologias convencionais, porém estão disponíveis em formatos práticos, simples e fornecem resultados mais rapidamente como é o caso do Petrifilm™ (3M Microbiology) utilizado por exemplo

para enumeração de aeróbios mesófilos; enterobactérias, coliformes totais e *Escherichia coli* e que fornece resultados em 24-48h.

Por outro lado, a pesquisa alternativa de patógenos emprega diversas metodologias com princípios bem distintos das metodologias convencionais (Fung, 2002). Os procedimentos convencionais empregados para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos são baseados no cultivo do micro-organismo usando-se meios de pré-enriquecimentos e meios seletivos, além das provas bioquímicas e sorológicas. Esta metodologia é demorada e trabalhosa (Matias et al., 2010), porém ainda são consideradas como oficiais no controle de qualidade de alimentos inclusive carne e carcaças de frango

Tanto metodologias convencionais como metodologias alternativas têm em comum uma etapa crucial para o sucesso de qualquer análise microbiológica: a amostragem. As possíveis maneiras pelas quais os alimentos podem ser amostrados para análises microbiológicas podem interferir de forma significativa nos resultados finais obtidos. O método de amostragem escolhido deve ser preciso e confiável o suficiente para que os resultados das análises microbiológicas sejam fidedignos com a real contaminação dos alimentos (Snijders et al., 1984).

Diferentes metodologias para amostragem de carcaças podem ser empregadas na coleta, e as mesmas são classificadas em destrutivas e não-destrutivas, considerando a possibilidade de retirada ou não de porções das carcaças (Capita et al., 2004). Na Tabela 1 é possível visualizar exemplos de cada uma dessas metodologias, com suas vantagens e desvantagens. Os métodos de excisão e esfregaço (swabbing) são os mais aceitos na coleta de amostras pela facilidade de execução e por fornecerem dados bastante confiáveis e reprodutíveis. O método de excisão é considerado o mais preciso, enquanto o método de esfregaço é considerado o mais prático (Scherer et al., 2006; Pearce & Bolton, 2005; Gill & Badoni, 2005; Gill et al., 2005; Capita et al., 2004; Gill et al., 2001; Gill & Jones, 2000; Palumbo et al., 1999; Sharpe et al., 1996).

Na amostragem destrutiva ocorre efetivamente a retirada de porções da carcaça, seja por excisão, raspagem ou cortes. Esse procedimento é considerado o que promove maior confiabilidade nos resultados, pois durante a homogeneização laboratorial é possível a retirada de praticamente todos os micro-organismos aderidos na porção a ser analisada (mesmo os mais fortemente aderidos ao material) (Capita et al., 2004; Bolton, 2003; Palumbo et al., 1999; Dorsa et al., 1997). Entretanto, é uma técnica que necessita de treinamento bastante especializado e não é interessante economicamente para a

indústria de alimentos, já que dependendo do local de amostragem, vários cortes ou mesmo carcaças, não poderão ser aproveitados. Assim, a técnica de excisão pode não ser totalmente adequada para o monitoramento de contaminação microbiológica, como recomendado pelo APPCC (Palumbo et al., 1999).

A amostragem não-destrutiva tem como objetivo minimizar os problemas observados pela amostragem destrutiva, fornecendo resultados microbiológicos finais similares. Esse tipo de amostragem pode ser realizado de diferentes maneiras, como esfregação de superfícies (swabs, em áreas conhecidas e delimitadas), métodos adesivos (membranas adesivas, também em áreas conhecidas e delimitadas) e lavagem completa de carcaças (especificamente indicada para pequenas carcaças, como de frangos). Cada um desses procedimentos possui diferentes vantagens e desvantagens, mas de forma geral não causam danos às carcaças analisadas, que podem ser aproveitadas economicamente. Entretanto, ocorre grande variação quanto à eficiência na retirada total dos micro-organismos presentes na área amostrada, porém invariavelmente menor que nos métodos destrutivos (Cox et al., 2010; Lindblad, 2007 ; Hutchison et al., 2006; Gill et al., 2005).

As técnicas de amostragem não-destrutivas não são capazes de recuperar todos os micro-organismos na superfície das carcaças. A recuperação das bactérias da superfície das carcaças pode variar significativamente dependendo do método escolhido e o material utilizado para a amostragem. Fung et al. (2000) testaram diferentes métodos de amostragem não-destrutivas em superfícies de carnes bovinas, e descreveram um bom desempenho de métodos simples, como o denominado “pop-up” (por meio de fitas adesivas), comparados a swabs. Métodos de amostragem não destrutivas foram comparados com várias técnicas destrutivas, e consideradas mais adequadas para o monitoramento da contaminação microbiológica em carcaças bovinas em estudo realizado por Dorsa et al. (1996), por serem mais práticos, rápidos e confiáveis. Em relação a carcaças de frango, Sharpe et al. (1996) recuperaram 20% de todos micro-organismos por lavagem superficial e 50% por raspagem. Gill & Badoni (2005) observaram uma equivalência nos resultados obtidos na análise microbiana quantitativa de frangos ao comparar as técnicas de excisão e de lavagem. Na mesma pesquisa foi verificado que a técnica do swab não foi eficiente na enumeração dos micro-organismos presentes na superfície da carcaça; entretanto a análise da pele do pescoço se comportou como uma alternativa viável na análise microbiológica quantitativa de frangos, sendo ainda uma técnica pouco destrutiva.

Quadro 1. Vantagens e desvantagens dos métodos de amostragens mais comuns utilizados para enumeração de micro-organismos de superfícies de carcaças cárneas (Capita et al., 2004).

Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Destrutivo</i>		
Excisão, raspagem	Promove a mais confiável retirada de micro-organismos de superfícies de carcaças, pois remove completamente até aquelas fortemente aderidas.	Natureza destrutiva, o que desvaloriza a carcaça; área amostrada limitada; exige treinamento específico.
<i>Não-destrutivo</i>		
Esfregaço (swabbing)	Pequeno ou ausência de dano às carcaças; usualmente empregada em grandes áreas da carcaça, adequada para detecção de micro-organismos com baixa incidência e distribuição desigual	Resultados pobres e variáveis na remoção de micro-organismos, pois apenas os fracamente aderidos são recuperados; o sucesso da amostragem é influenciada por diferentes fatores inerentes a coleta e amostras
Amostragem por contato	Ausência de dano à superfícies; possibilidade de microscopia e incubação direta da área amostrada; permite a imagem direta da distribuição dos micro-organismos na superfície da carcaça; simples e rápida, requer poucos materiais	Inaplicável quando as contagens esperadas são superiores a 100 UFC/cm ² ; ausência de precisão; inadequada para carcaças com superfícies irregulares (como frango); necessidade de vários pontos de amostragem para obtenção de representatividade
Rinsing (lavagem superficial)	Pequeno ou ausência de dano às carcaças; remoção praticamente de todos os micro-organismos superficiais e cerca de 10 vezes mais que por esfregaço	Adequado apenas para carcaças de frango ou cortes de pequenas porções de carnes

A amostragem por esfregaço de carcaças é considerada a metodologia não-destrutiva mais popular empregada no controle de qualidade em indústrias de alimentos (Capita et al., 2004). Tanto essa metodologia como a destrutiva por excisão são consideradas adequadas e oficiais para o controle de qualidade microbiológico em carcaças de animais em abatedouros na Comunidade Européia (Byrne et al., 2005; Bolton, 2003). Entretanto, não existe um consenso entre uma possível equivalência entre essas metodologias, sendo que vários aspectos são considerados como possíveis interferentes (Scherer et al., 2006; Hutchison et al., 2006; Hutchison et al., 2005; Gill & Badoni, 2005; Gill et al., 2005; Miraglia et al., 2005; Pearce & Bolton, 2005; Gill et al.,

2001; Gill & Jones, 2000; Palumbo et al., 1999; Dorsa et al., 1997; Dorsa et al., 1996; Snijders et al., 1984).

Uma importante fonte de variação nos dados obtidos por esfregação de superfícies é o material utilizado na amostragem. Amostragem por esfregaços superficiais são usualmente feitos com swabs de algodão ou gaze, porém esponjas de poliuretano e celulose também são freqüentemente utilizados (Pearce & Bolton, 2005; Capita et al., 2004; Gill et al., 2001; Fung et al., 2000; Gill & Jones, 2000). Materiais mais abrasivos tendem a recuperar melhor micro-organismos presentes em menores concentrações e aqueles com maior capacidade de adesão (Capita et al., 2004; Bolton, 2003). Melhor desempenho de metodologias de esfregaços pode ser obtida quando se aplica a técnica wet-dry, que consiste em aplicação de swabs úmidos e secos sucessivamente na coleta de amostras superficiais (Hutchison et al., 2005). Ainda, pressão no momento da amostragem, tempo, direção, sentido e falta de padronização na coleta podem também gerar diferenças significativas nos resultados finais obtidas a partir de técnicas não destrutivas de coleta de amostras (Scherer et al., 2006; Whyte et al., 2004; Capita et al., 2004). Quando presentes em altas concentrações, os micro-organismos tendem a formar aglomerados relativamente grandes nas superfícies das carcaças e dessa forma são facilmente removidos por técnicas não destrutivas.

Além das possíveis interferências citadas, a espécie animal das carcaças amostradas é decisiva na escolha do método mais adequado. Além de ser necessário considerar a integridade ou não da carcaça após a amostragem, algumas técnicas não podem ser aplicadas simplesmente por serem inviáveis e não práticas (Hutchison et al., 2005; Pearce & Bolton, 2005). Mesmo em carcaças de uma mesma espécie animal pode ocorrer grande variação entre a microbiota predominante, que pode possuir capacidade de adesão bastante variável (Gill et al., 2006). Ainda, a área da carcaça amostrada pode interferir, dependendo da composição predominante de gordura, pele ou músculo, umidade e diferenças na textura. Na Tabela 2 são apresentados alguns dos vários trabalhos sobre procedimentos de amostragem em carcaças animais.

Quadro 2. Trabalhos de avaliação de procedimentos de amostragem de carcaças animais, considerando diferentes grupos de micro-organismos pesquisados.

Referência	Carcaça animal	Técnicas avaliadas	Micro-organismos pesquisados
Cox et al., 2010	Frango	Lavagem superficial; Excisão	<i>Salmonella</i> ; <i>E. coli</i>
Williams et al., 2010	Frango	Lavagem superficial em diferentes volumes	Enterobactereaceae; Coliformes; <i>E. coli</i> ; <i>Salmonella</i> ; <i>Campylobacter</i>
Simmons et al., 2008	Frango	Exudato e Lavagem superficial	<i>Campylobacter</i> spp
Lindblad, 2007	Suíno	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos; Enterobactereaceae; <i>E. coli</i>
Hutchison et al., 2006	Frango	Excisão e Lavagem superficial	Aeróbios mesófilos; Enterobactereaceae; Coliformes totais; <i>E. coli</i> ; <i>Pseudomonas</i>
Gill & Badoni, 2005	Frango	Excisão; Swab; Lavagem superficial	Aeróbios mesófilos; Coliformes Totais; <i>E. coli</i>
Hutchison et al., 2005	Bovino; Suíno; Ovino	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos
Miraglia et al., 2005	Suíno e Bovino	Excisão e Swab de diferentes tamanhos	Aeróbios mesófilos; Enterobactereaceae
Pearce & Bolton, 2005	Bovino; Suíno; Lamb	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos; Enterobactereaceae
Gill et al., 2005	Frango	Excisão; Swab; Lavagem superficial	Aeróbios mesófilos; Coliformes Totais; <i>E. coli</i>
Gill et al., 2001	Bovino	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos; Coliformes Totais; <i>E. coli</i>
Gill & Jones, 2000	Suíno e Bovino	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos; Coliformes Totais; <i>E. coli</i>
Palumbo et al., 1999	Suíno	Excisão e Swab	Aeróbios mesófilos; Coliformes Totais; <i>E. coli</i>
Dorsa et al., 1996	Bovino	Excisão; Swabs; Tela de chapa; Malha 3M	Aeróbios mesófilos

Para controle de qualidade microbiológica durante o abate de frangos no Brasil, o MAPA indica a excisão de 25 g divididos entre peito, coxa ou asa, proximidades da cloaca e dorso (Brasil, 2003b). Porém, diferentes órgãos oficiais de controle recomendam métodos não destrutivos para amostragem, como lavagem superficial e esfregaços de áreas específicas em diferentes porções das carcaças (FDA, 2008; USDA/FSIS, 2008; ICMSF, 1988). Apesar dessas recomendações, não há um consenso na comunidade científica sobre o método de amostragem mais indicado para a coleta das amostras de carnes para a análise microbiológica.

Referências

- ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e exportadores de frango. *Estatística*. <<http://www.abef.com.br/>>. Acessado em 15/12/2010.
- Almeida, P.F.; Silva, E.N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.44, n.2, p.105-120, 1992.
- Altekruse, S.F.; Bauer, N.; Chanlongbutra, A.; DeSagun, R.; Naugle, A.; Schlosser, W.; Umholtz, R.; White, P. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United States, 2000-2005. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.12, p.1848-1852, 2006.
- Alvarez-Astorga, M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Moreno, B.; Garcia-Fernandez, M.C. Microbiological quality of retail chicken by- products in Spain. *Meat Science*, v. 62, p.45-50, 2002.
- Bolton, D.J. The EC decision of the 8th June 2001 (EC/71/2001): excision versus swabbing. *Food Control*, v.1, p.07-209, 2003.
- Borch, E.; Nesbakken, T.; Christensen, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal Food Microbiology*, n.30, p.9-25, 1996.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 368 de 04/09/1997. Regulamento Técnico sobre as condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial da União*, 08/09/1997, Seção 1, p. 19697, 1997.

- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46 de 10/02/1998. Manual genérico de procedimento para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, 16/03/1998, Seção 1, p. 24, 1998.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5 de 24/01/2000. Aprova o regulamento técnico “métodos de amostragem para controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal”. *Diário Oficial da União*, 27/01/2000, Seção 1, p. 43, 2000.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 2001. (a)
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13, de 02/01/2001. Aprova regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. *Diário Oficial da União*, 10/01/2001. 2001.(b)
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70 de 06/10/2003. Programa de redução de patógenos: monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus. *Diário Oficial da União*, 10/10/2003, Seção 1, p.9, 2003a.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, 18/09/2003, Seção 1, p.14, 2003b.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica - AGE. Projeções do agronegócio: Mundial e Brasil até 2016/17. 2006. Disponível: URL: www.agroprecisa.com.br/site/noticias/download/Agronegocio_10anos.pdf. Acesso: 27/11/2010.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em frango - PREBAF*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p.186, 2008.

- Brown, M.H.; Gill, C.O.; Hollingsworth, J.; Nickelson, R.; Seward, S.; Sheridan, J.J.; Stevenson, T.; Sumner, J.R.; Theno, D.M.; Usborne, W.R.; Zink, D. The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.7-16, 2000.
- Byrne, B.; Dunner, G.; Lyng, J.; Bolton, D.J. Microbiological carcass sampling methods to achieve compliance with 2001/471/EC ad new hygiene regulations. *Research in Microbiology*, v.156, p.104-106, 2005.
- Capita, R.; Prieto, M.; Alson-Calleja, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, v.67, n.6, p.1303-1308, 2004.
- Carvalho, L.T.; Costa, P.S.; Carvalho, A.L.T. Análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. *Higiene Alimentar*, v.16, n.95, p.34-42, 2002.
- Cason, J.A.; Berrang, M.E.; Buhr, R.J.; Cox, N.A. Effect of prechill fecal contamination on number of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.67, n.9, p.1829-1833, 2004.
- Chrystal, N.D.; Hargraves, S.J.; Boa, A.C.; Ironside, C.J. Counts of *Campylobacter* spp and Prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, v.71, n.12, p.2526-2532, 2008.
- Cox, N.A., Richardson, L.J., Cason, J.A., Buhr, R.J., Vizzier-Thaxton, V., Smith, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Romanenghi, C.P., Pereira, L.V.B., Doyle, M.P. Comparison of neck skin excision and whole carcasses rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.73, n.5, p.976-980, 2010
- Dominguez, S.A., Schaffner, D.W. Survival of *Salmonella* in processed chicken products during frozen storage. *Journal of Food Protection*, v.72, n.10, p.1088-1092, 2009
- Dorsa, W.J.; Cutter, C.N.; Siragusa, G.R. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, v.22, p.39-41, 1996.

- Dorsa, W.J.; Siragusa, G.R.; Cutter, C.N.; Berry, E.D.; Koohmaraie, M. Efficacy of using a sponge sampling method to recover low levels of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and aerobic bacteria from beef carcass surface tissue. *Food Microbiology*, v.14, p.63-69, 1997.
- Eblen, D.R.; Barlow, K.E.; Naugle, A.L. U.S. Food Safety and Inspection Service Testing for *Salmonella* in selected raw meat and poultry products in the united states, 1998 through 2003: An establishment-level analysis. *Journal of Food Protection*, v.69, n.11, p.2600-2606, 2006.
- EC. Comission Regulation. EC no 1441/2007 de 5 de dezembro de 2007 que altera o regulamento (CE) no 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Official Journal of the European Union. L 322, p. 12 – 29; 7/12/2007.
- FDA - Food and Drug Association. Bacteriological Analytical Manual Online. Food and Drug Association, Washington. <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>. Acessado em 01/08/2008.
- Freitas, C.G.; Santana, A.P.; Silva, P.H.C.; Gonçalves, V.S.P.; Barros, M.A.F.; Torres, F.A.G.; Murata, L.S.; Perecmanis, S. PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, p.15-22, 2010.
- Fung, D.Y.C.; Thompson, L.K.; Crozier-Dodson, B.A.; Kastner, C.L. Hands-free, “pop-up”, adhesive tape method for microbial sampling of meat surfaces. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v.8, p.209-217, 2000.
- Fung, D.Y.C. Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.1, n.1, p.03-22, 2002.
- Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Daube, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, v.71, n.1, p.35-45, 2008.
- Gill, C.O.; Badoni, M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rising, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology*, v.27, p.101-107, 2005.

- Gill, C.O.; Badoni, M.; McGinnis, J.C. Microbiological sampling of meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.64, n.3, p.325-334, 2001.
- Gill, C.O.; Badoni, M.; Moza, L.F.; Barbut, S.; Griffiths, M.W. Microbiological sampling of poultry carcass portions by excision, rising, or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.68, n.12, p.2718-2720, 2005.
- Gill, C.O.; Jones, T. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.63, n.2, p.167-173, 2000.
- Gill, C.O.; Moza, L.F.; Badoni, M.; Barbut, S. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant. *International Journal of Food Microbiology*, v.110, p.187-193, 2006.
- Hutchison, M.L.; Walters, L.D.; Avery, S.M.; Reid, C.A.; Wilson, D.; Howell, M.; Johnston, A.M.; Buncic, S. A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.68, n.10, p.2155-2162, 2005.
- Hutchison, M.L.; Walters, L.D.; Mead, G.C.; Howell, M.; Allen, V.M. Na assessment of sampling methods and microbiological hygiene indicators for process verification in poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.69, n.1, p.145-153, 2006.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in Foods 1: Their Significance and Methods of Enumeration*. University of Toronto Press, Toronto, 1988.
- Jay, J.M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7 ed., New York: Springer. 790pp. 2005.
- Kotula, K.L.; Pandya Y. Bacterial Contamination of Broiler Chickens before Scalding. *Journal of Food Protection*, v.58, n.12, p.1326-1329, 1995.
- Lahellec, C.; Colin, P. Influence of processing on *Salmonella* contamination of poultry carcass: Possibilities of improvement. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *Salmonella*, 1984, New Orleans, LA. *Proceedings...* Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists, p.249-256; 1984..

- Lillard, H.S. Comparison of sampling methods and implications for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. *Journal of Food Protection*, v.51, p.405-408, 1988.
- Lillard, H.S. Determination of the stage in broiler processing where firm bacterial attachment first occur. In: 78TH Ann. Meeting of the Poultry Science Association Inc., 78, 1989, USA: *Abstracts...* 1989. p. 190. *Poultry Science*, v.68, p.190, 1989.
- Lillard, H.S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, v.53, p.202-204, 1990.
- Lindbland, M. Microbiological sampling of swine carcasses: A comparison of data obtained by swabbing with medical gauze and data collected routinely by excision at Swedish abattoirs. *International Journal of Food Microbiology*, v.118, p.180-185, 2007.
- Matias, B.G.; Pinto, P.S.A.; Cossi, M.V.C.; Silva Jr., A.; Vanetti, M.C.D.; Nero, L.A. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry Science*, v.89, p.1524-1529, 2010.
- Miraglia, D.; Ranucci, D.; D'Ovidio, V.; Branciarri, R.; Severini, M. Comparison between carcass microbial load recovered by swabbing surfaces of different size and using the reference excision method. *Veterinary Research Communications*, v.29, n.S2, p.339-341, 2005.
- Muth, M.K.; Fahimi, M.; Karns, S.A. Analysis of *Salmonella* control performance in U.S. young chicken slaughter and pork slaughter establishments. *Journal of Food Protection*, v.72, n.1, p.6-13, 2009.
- Palumbo, S.A.; Klein, P.; Capra, J.; Eblen, S.; Miller, A.J. Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiology*, v.16, p.459-464, 1999.
- Pearce, R.A.; Bolton, D.J. Excision vs sponge swabbing - a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.896-900, 2005.

- Rampling, A.; Upson, R.; Peters, E.; Anderson, J.R.; Ward, L.R.; Rowe, B. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. *Lancet*, n.14, p.436-438, 1989.
- Rasschaert, G.; Houf, K.; De Zutter, L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.333-341, 2007.
- Reiter, M.G.R.; Fiorese, M.L.; Moretto, G.; López, M.C.; Jordano, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, v.70, n.7, p.172-172, 2007.
- Rodrigues, A.C.A; Pinto, P.S.A; Vanetti, M.C.D; Bevilacqua, P.D; Pinto, M.S; Nero, L.A. Analysis and monitoring of critical points in the poultry slaughter using microbiological indicators. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1948-1953, 2008.
- Scherer, K.; Bartelt, E.; Sommerfeld, C.; Hildebrandt, G. Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. *International Journal of Food Microbiology*, v.108, p.115-119, 2006.
- Schneider, I.S. *Processamento Industrial de aves e seus subprodutos*. Editora Brasileira da Agricultura S.A. São Paulo, SP, 100p. 1973.
- Scuderi, G.; Fantasia, M.; Filetici, E.; Anastasio, M.P. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. *Epidemiology and Infection*, v.116, p.257-265, 1996.
- Sharpe, A.N.; Isigidi Bin Kingombe, C.; Watney, P.; Parrington, L.J.; Dudas, I.; Diotte, M.P. Efficient nondestructive samples for carcasses and other surfaces. *Journal of Food Protection*, v.59, n.7, p.757-763, 1996.
- Simmons, M.; Hiett, K.L.; Stern, N.J.; Frank, J.F. Comparison of poultry exudate and carcass rinse sampling methods for the recovery of *Campylobacter* spp. subtypes demonstrates unique subtypes recovered from exudates. *Journal of Microbiological Methods*, v.74, p.89-93, 2008.
- Smith, K.E.; Medus, C.; Meyer, S.D.; Boxrud, D.J.; Leano, F.; Hedberg, C.W.; Elfering, K.; Braymen, C.; Bender, J.B.; Danila, R.N. Outbreaks of Salmonellosis in Minnesota (1998 through 2006) associated with frozen, microwaveable, breaded, stuffed chicken products. *Journal of Food Protection*, v.71, n.10, p.2153-2160, 2008.

- Snijders, J.M.A.; Janssen, M.H.W.; Gerats, G.E.; Cortiaensen, G.P. A comparative study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p.229-236, 1984.
- Tavechio, A.T.; Fernandes, S.A.; Neves, B.C.; Dias, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista Instituto de Medicina Tropical*, v.38, n.5, p.315-332, 1996.
- Tsola E.; Drosinos E.H.; Zoiopoulos, P. Impacto f poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, v.19, p.423-431, 2008
- USA - USDA, 2003. Code of Federal Regulations, Title 9 (Animals and Animals Products), Chapter III (Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture), Part 381 (Poultry Products Inspection Regulations). Revised at 01 January 2003, available at http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/9cfr381_03.html
- USDA/FSIS - United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service. *Microbiology Laboratory Guidebook*, Capítulo 4.04, Outubro de 2008. <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>
- Ward, L.R.; Threlfall, E.J. *Human salmonellosis in England and Wales - current situation*. In: *Salmonella and Salmonellosis Symposium*, 1997, Ploufragan, França, p.547-549. 1997.
- Whyte, P.; McGill, K.; Monahan, C.; Collins, J.D. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. *Food Microbiology*, v.21, p.59-65, 2004.
- Williams, M.S.; Ebel, E.D.; Golden, N.J.; Berrang, M.E.; Bailey, J.S.; Hartnett, E. Estimating removal rates of bacteria from poultry carcasses using two whole-carcass rinse volumes. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, p.140-146, 2010.
- Zweifel, C., Baltzer, D., Stephan, R. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determination by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. *Meat Science*, v.69, p.559-566, 2005.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O trabalho apresentado tem como objetivo geral a avaliação de quatro procedimentos de amostragem de carcaças de frango, duas destrutivas (excisão de pele e excisão de tecidos) e duas não-destrutivas (esfregação de área delimitada e lavagem superficial de carcaça), para a enumeração de micro-organismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Enterobacteriaceae* e *Echerichia coli*) e detecção de *E. coli* e *Salmonella* spp., visando oferecer alternativas em procedimentos de coleta de amostras e análises microbiológicas para o monitoramento da qualidade e segurança de carcaças de frango, com aplicação direta na Inspeção e em programas de controle de qualidade como o APPCC.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a qualidade microbiológica e a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frango resfriadas comercializadas no Município de Viçosa e Região, submetidas ou não a inspeção;
- ✓ Avaliar a influência de quatro tipos de amostragem de carcaças de frango na enumeração de micro-organismos indicadores e *Salmonella* spp. em carcaças de frango, além de estabelecer uma equivalência entre esses procedimentos.
- ✓ Avaliar a influência de quatro tipos de amostragem de carcaças de frango para detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., verificando suas limitações e possíveis equivalências.

ARTIGO 1. *Salmonella* spp. e qualidade microbiológica de carcaças de frango resfriadas ‘in natura’, submetidas e não submetidas a fiscalização oficial no Brasil

Resumo

***Salmonella* spp. e qualidade microbiológica de carcaças de frango frescas não temperadas, submetidas e não submetidas a fiscalização oficial no Brasil.**

Considerando a importância da qualidade e segurança microbiológica de carcaças de frango destinada a consumo humano, 60 amostras desse produto submetidas (30) ou não (30) a fiscalização oficial foram submetidas a análises laboratoriais para enumeração de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais, *Escherichia coli*, e detecção de *Salmonella* spp. As contagens médias obtidas para todos os indicadores de higiene não apresentaram diferença significativa entre amostras inspecionadas ou não ($p > 0.05$). As frequências de amostras contaminadas por *E. coli* (contagens superiores a 2 log UFC/g) e *Salmonella* spp. foram estatisticamente similares para amostras inspecionadas ou não. Diferenças estatísticas foram observadas apenas para amostras com contaminação por aeróbios mesófilos superiores a 3, 4 e 5 log UFC/g, sendo observadas maiores frequências para amostras não inspecionadas ($p < 0.05$). Apesar de poucas diferenças na contaminação microbiológica em carcaças de frango inspecionadas ou não, a fiscalização oficial considera outros aspectos de qualidade e segurança que não foram avaliados no presente estudo, sendo indispensável em toda a cadeia produtiva avícola.

Palavras-chave: frango, inspeção, *Salmonella*, indicadores de higiene

Abstract

Inspected and uninspected fresh chicken commercialized in Brazil: *Salmonella* spp. occurrence and microbiological quality.

Considering the relevance of microbiological quality and safety of chicken consumed by humans, 60 samples of this product submitted (30) and not submitted (30) to official Brazilian inspection services were analyzed to enumerate hygiene indicator microorganisms (mesophilic aerobes, enterobacteriaceae, total coliforms and *Escherichia coli*) and to detect *Salmonella* spp. The mean counts of indicator microorganisms did not present significant differences ($p > 0.05$) considering whether samples inspected or not. Also, no significant differences ($p > 0.05$) were observed for the frequencies of *Salmonella* spp. and *E. coli* (higher than 2 log cfu/g) between samples submitted or not to inspection. Statistical differences were observed between the two sample classes only for the frequencies of counts of mesophilic aerobes higher than 3, 4 and 5 log cfu/g ($p < 0.05$). Despite the slight differences between the microbiological quality of chicken carcasses submitted or not to inspection, official food monitoring considers other aspects of safety and quality that were not evaluated but which are irreplaceable in all avian foods chain.

Keywords: chicken, inspection, *Salmonella*, hygiene indicators

Introdução

A produção brasileira de carne de frango em 2010 é estimada em 11.4 milhões de toneladas, representando a terceira maior produção mundial, posição que o país ocupa desde 2003. Como resultado, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, com 3,3 milhões de toneladas destinadas ao mercado externo e superando o maior produtor mundial, os Estados Unidos da América. Outro fator que favorece essa atividade é o grande mercado consumidor brasileiro, composto por 190 milhões de habitantes com um consumo per capita de aproximadamente 36 kg de carne de frango por ano (ABEF, 2010). Em paralelo ao desenvolvimento da produção e consumo desse produto, as exigências sobre sua qualidade e segurança aumentaram, determinando uma grande evolução em programas de controle de sua qualidade e segurança (Brasil, 1997; Gill et al., 2006).

A carne de frango está naturalmente susceptível a contaminação por micro-organismos de diferentes origens, como os próprios animais portadores e os ambientes de abate e processamento (Jay et al., 2005; Sakhare et al., 1999). Micro-organismos deteriorantes e indicadores de higiene podem contaminar a carne de frango nessas etapas, sugerindo condições inadequadas de produção e comprometendo a sua qualidade final. Ainda, micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni* podem contaminar as carcaças de frango e se manterem viáveis até momentos antes do consumo (Kotula & Pandya, 1995; Luber, 2009). Alguns desses micro-organismos se desenvolvem durante a conservação sob refrigeração, o que aumenta a preocupação com a sua qualidade e segurança microbiológica (Borch et al., 1996; Cason et al. 2004).

Salmonella spp., particularmente, é considerado um dos patógenos mais frequentemente associados a carne de frango, sendo constantemente isolado como agente causador de casos e surtos de toxinfecções alimentares envolvendo consumo desse produto (Altekruse et al., 2006; Wang et al., 2008). Esse patógeno possui grande importância em Saúde Pública pelos diversos sintomas que pode determinar no ser humano, pela grande despesa gerada direta e indiretamente com a doença, e por ser um dos principais parâmetros de segurança microbiológica em alimentos (Brasil, 2005b; Sumner et al., 2004; Jorgensen et al., 2002).

A verificação desses parâmetros de qualidade e segurança, além de outros procedimentos higiênicos durante a produção e processamento dos alimentos, é uma

responsabilidade oficial dos governos dos países. No Brasil essa fiscalização está sob responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que promove essa fiscalização no âmbito nacional (Serviço de Inspeção Federal), estadual (Serviço de Inspeção Estadual) ou municipal (serviço de Inspeção Municipal) (Brasil, 1989). Além do controle na produção, os alimentos disponíveis aos consumidores também devem ser fiscalizados em seus pontos de comercialização, sendo essa fiscalização responsabilidade do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil, 2010). No Brasil, a comercialização de alimentos de origem animal sem fiscalização oficial prévia é proibida, e os produtores e comerciantes que praticam essa atividade estão sujeitos a penas previstas na legislação (Brasil, 1952). Apesar disso, é possível encontrar no mercado informal como feiras livres, carcaça de frango sendo vendida sem nenhum tipo de fiscalização, não havendo no entanto dados estatísticos na literatura sobre a frequência dessa prática.

Considerando a importância da fiscalização na qualidade e segurança de produtos de origem animal, esse trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frango resfriadas comercializadas no Brasil, submetidas ou não a fiscalização oficial.

Material e Métodos

Coleta de amostras e diluições

Um total de 60 carcaças resfriadas de frango, "in natura", foram coletas em suas embalagens originais em estabelecimentos comerciais e feiras livres de Viçosa, MG, Brasil e região, sendo 30 provenientes de indústrias com fiscalização oficial (Serviço de Inspeção Federal ou Serviço de Inspeção Estadual), identificadas por carimbos oficiais de inspeção, e 30 não fiscalizadas. Todas as carcaças foram mantidas sob refrigeração desde a coleta até o momento das análises laboratoriais, sendo em média um período de 2 horas, quando fragmentos de pele e músculos foram retirados assepticamente até atingir 50 g. Dessa alíquota, 25 g foram destinados para pesquisa de *Salmonella* spp., e 25 g para pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene, aos quais foram adicionados 225 mL de água peptonada 0.1% (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) e homogeneizadas. A partir dessa diluição inicial (1:10), as amostras foram diluídas em escala seriada decimal utilizando o mesmo diluente (Brasil, 2005a).

Pesquisa de indicadores de higiene.

Duas diluições de cada carcaça foram selecionadas e semeadas em Petrifilm™ AC (3M Microbiology, St Paul, MN, USA) para enumeração de aeróbios mesófilos (AM) (incubação a 35 °C por 24-48h), Petrifilm™ EC (3M Microbiology) para enumeração de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) (incubação a 35 °C por 24-48h), e Petrifilm™ Enterobacteriaceae (3M Microbiology) para enumeração de enterobactérias (EB) (incubação a 35 °C por 24-48h). Após incubação, as colônias formadas nas áreas semeadas foram enumeradas considerando as características típicas de cada grupo: AM colônias vermelhas, CT colônias vermelhas e azuis com formação de gás, EC colônias azuis com formação de gás, e EB colônias amarelas, amarelas com gás e apenas com gás. Todos os resultados foram expressos em Unidades Formadas de Colônias por g (UFC/g).

Pesquisa de Salmonella spp.

As amostras foram avaliadas quanto à presença de *Salmonella* spp. de acordo com o protocolo ISO 6579, com algumas modificações (ISO, 2002). As alíquotas de 25 g das amostras foram adicionadas a 225 mL de água peptonada 1% (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), com incubação a 37 °C por 18h (etapa de pré-enriquecimento). Em seguida, 1 mL da cultura obtida foi inoculado em 10 mL de caldo Selenito Cistina (Oxoid) (incubação a 37 °C por 24h) e 0,1 mL em 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid) (42,5 °C por 24h, em Banho-Maria) (enriquecimento seletivo). Após incubação, as culturas foram estriadas em ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Oxoid) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24h (plaqueamento seletivo). Colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella* spp. foram repicadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (Oxoid) e ágar Lisina Ferro (Oxoid) (incubação a 35 °C por 24h), para verificação de reações típicas desse micro-organismo. Culturas que apresentaram reações típicas em pelo menos um desses meios de cultura foram submetidas à confirmação sorológica com antisoros polivalentes somático e flagelar (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), e confirmação molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (Galán et al., 1992; Alvarez et al., 2004).

As culturas suspeitas foram purificadas após 3 passagens sucessivas em ágar tripticase de soja (Oxoid), incubadas a 35 °C por 24h, e semeadas em água peptonada 0.1% (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24h. As culturas obtidas foram submetidas à

extração de DNA com o *Wizard® Genomic Purification Kit* (Promega, Madison, WI, EUA). Para confirmação do gênero *Salmonella* spp. foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos: *invA* (Galán et al., 1992) e *ompC* (Alvarez et al., 2004). O par *invA* (forward: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA; reverse: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C), com 284 pb, foi projetado para detectar e amplificar um fragmento de DNA do gene *invA*, responsável pela invasão do micro-organismo nos enterócitos, e foi pesquisado com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 7 min (Galán et al., 1992). O par *ompC* (forward: ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG; reverse: CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG; 204 pares de bases), com 204 pb, amplifica um fragmento do gene *ompC* de *Salmonella* spp., responsável por oferecer resistência a alguns antimicrobianos, e foi pesquisado com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, com extensão final a 72 °C por 5 min (Alvarez et al., 2004). As reações foram realizadas com o mix comercial *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL de cada primer e 2 µL do DNA extraído de cada cultura. O controle negativo foi feito substituindo o DNA por 2 µL de água estéril livre de nuclease. O volume final de reação foi 25 µL para os dois protocolos de amplificação. Os produtos de amplificação foram corados com GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % e observados em transiluminador.

Tanto para pesquisa convencional de *Salmonella* spp quanto para realização da PCR, foram utilizados como controle positivo, cultura ATCC 13076.

Considerando todas as etapas de confirmação, os resultados finais foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de cada amostra.

Análise dos dados

As contagens obtidas de micro-organismos indicadores de higiene foram convertidas em log₁₀ e avaliadas quanto à distribuição normal e homogeneidade, sendo então submetidas à Análise de Variância (ANOVA) para verificação de diferenças significativas entre amostras submetidas ou não à fiscalização (p < 0.05). Ainda, as amostras foram comparadas considerando as frequências de resultados positivos para *Salmonella* spp. e *E. coli* (acima de 2.0 log UFC/g) por chi-quadrado (p < 0.05).

Finalmente, as amostras foram classificadas de acordo com os níveis de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene, e comparadas por chi-quadrado ($p < 0.05$). Nessa análise, parâmetros de qualidade e segurança microbiológica para carcaças de frango adotados no Brasil e em outros países foram utilizados como referência (EC, 2007; Brasil, 2003a; USA, 2003; Alvarez-Astorga et al., 2002; Brasil, 2001).

Resultados e Discussão

Uma análise descritiva dos dados obtidos quanto à contagem de micro-organismos indicadores de higiene das amostras de carcaças de frango resfriadas analisadas é apresentada na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de contaminação entre carcaças de frango inspecionadas e não inspecionadas ($p > 0.05$). De forma geral, as contagens de micro-organismos indicadores de higiene nas amostras analisadas foram superiores aos obtidos em estudos similares (Ghafir et al., 2008; Hutchison et al., 2006; Gill et al., 2005a; Capita et al., 2004; Whyte et al., 2004). Esses resultados indicam condições inferiores de qualidade e segurança de produção deste produto, tanto de carcaças de frango fiscalizadas como as não.

Tabela 1: Parâmetros estatísticos de contaminação (log UFC/g) por micro-organismos indicadores de higiene em amostras de carcaças de frango resfriadas, submetidas ou não a inspeção oficial.

MO Indicador/inspeção	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	Mínimo	Mediana	Máximo
<i>Aeróbios Mesófilos</i>								
Inspecionado	30	5.44	0.94	0.19	0.89	4.00	5.45	7.08
Não inspecionado	30	5.66	0.68	0.12	0.46	4.79	5.44	7.19
ANOVA		$F_{(1, 54)} = 0.31, p = 0.314$						
<i>Enterobacteriaceae</i>								
Inspecionado	30	4.29	1.12	0.22	1.26	2.00	4.20	6.29
Não inspecionado	30	4.17	0.52	0.10	0.27	3.30	4.17	5.57
ANOVA		$F_{(1, 52)} = 0.27, p = 0.605$						
<i>Coliformes Totais</i>								
Inspecionado	30	3.06	0.71	0.14	0.50	2.00	2.99	4.46
Não inspecionado	30	3.13	0.48	0.09	0.23	2.00	2.99	4.11
ANOVA		$F_{(1, 54)} = 0.16, p = 0.693$						
<i>Escherichia coli</i>								
Inspecionado	30	2.72	0.57	0.12	0.32	2.00	2.72	3.76
Não inspecionado	30	2.61	0.44	0.11	0.20	2.00	2.54	3.45
ANOVA		$F_{(1, 38)} = 0.42, p = 0.523$						

n: número de amostras; ANOVA: análise de variância; p: nível de significância

As frequências de resultados positivos para EC (contaminação acima de 2.0 log UFC/g, uma vez que foi a primeira diluição obtida por este protocolo) em carcaças inspecionadas e não inspecionadas são apresentadas na Tabela 2, sendo observada ausência de diferença significativa ($p > 0.05$). Em estudo similar, Gill et al. (2005a), verificaram que 12 de 25 amostras de frango analisadas apresentaram contaminação por EC superior a 2.0 log UFC/g. Entretanto, outros estudos mostram maiores frequências de contaminação por EC em níveis acima de 2.0 log UFC/g em carcaças de frango, atingindo até 100% das amostras analisadas (Ghafir et al., 2008; Gill et al., 2006; Gill et al., 2005b).

Apesar da alta frequência de amostras com contagens de EC superiores a 2.0 log UFC/g, *Salmonella* spp. foi encontrado em apenas duas amostras: uma inspecionada e uma não inspecionada (Figura 1, Tabela 2). Pelos dados obtidos observa-se uma menor frequência no isolamento desse patógeno em carcaças de frango, quando comparados com outros estudos. Em um estudo realizado no Brasil, no estado de São Paulo, a prevalência observada de *Salmonella* spp. em carne de frango foi de 19.1% (Tessari et al., 2003). Na Bélgica, Ghafir et al. (2008) realizaram um estudo cronológico de *Salmonella* spp. em diversos alimentos e verificaram uma variação entre 9.5 e 25.6% de resultados positivos em carcaças e carne de frango ao longo de vários anos. Na Inglaterra, *Salmonella* spp. foi isolada em 31% das amostras de carcaças de frango analisadas (Jorgensen et al., 2002). A baixa frequência de *Salmonella* spp. encontrada neste estudo indica que as carcaças analisadas possuem maior segurança microbiológica relacionada a esse patógeno, quando comparada a outros trabalhos. Entretanto, considerando que a recomendação usual para segurança microbiológica é ausência de *Salmonella* spp. em 25 g dos alimentos (Luber, 2009; Hugas & Tsigarida, 2008; EC, 2007), as duas amostras positivas representariam riscos aos consumidores.

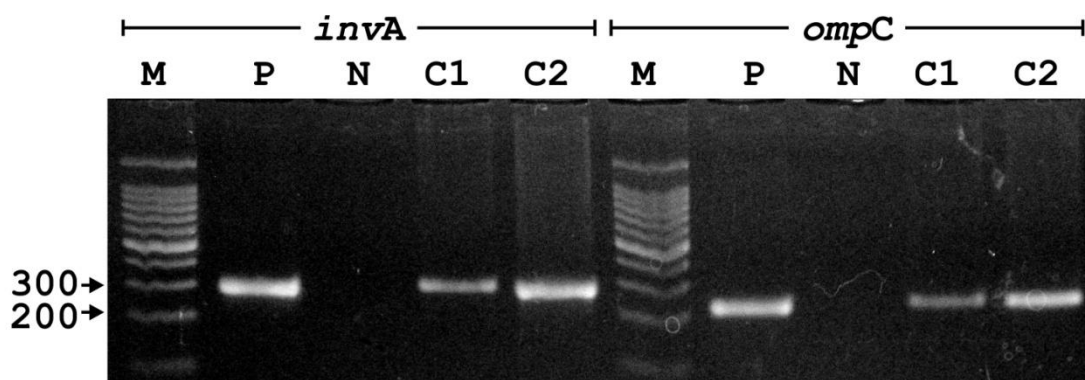


Figura 1. Produtos de reações de PCR com primers para detecção dos genes *invA* e *ompC* separado em gel de agarose obtido por eletroforese horizontal, corados por GelRed e observados em transiluminador. M: Marcador de peso molecular (100 a 1000 pb), P: controle positivo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); N: controle negativo (água milli-Q), C1 e C2: culturas testadas.

Na legislação de diversos países são poucos os parâmetros microbiológicos exigidos para carne ou carcaças de frango. Na legislação brasileira o único parâmetro oficial é para produtos destinados ao consumo humano e disponíveis em pontos comerciais, onde apenas coliformes a 45 °C devem ser pesquisados e presentes em contagens inferiores a 4.0 log UFC/g (Brasil, 2001). No Brasil ainda existem dois programas oficiais de monitoramento de *Salmonella* spp. em carcaças de frango, visando o controle na indústria (Programa Nacional de Redução de Patógenos, Brasil, 2003a) e no comércio (Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF, Brasil, 2008). Segundo o PREBAF, a frequência de resultados positivos para *Salmonella* spp. (Tabela 2) é considerada relativamente baixa. A legislação européia prevê apenas a pesquisa de *Salmonella* spp. nos produtos destinados diretamente ao consumo humano, que deve estar ausente em 25 g da amostra analisada (EC, 2007). Nos EUA o controle sanitário de carcaças de frango deve ser realizado nas indústrias, com planos de amostragem definidos e parâmetros específicos para EC (2.0 a 3.0 log UFC/g) e *Salmonella* spp.

Tabela 2. Frequência de resultados positivos para *E. coli* (≥ 2.0 log UFC/g) e *Salmonella* em frangos resfriados submetidos ou não a fiscalização oficial.

Amostras/Inspeção	n	<i>E. coli</i> (mínimo de 2.0 log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp. (mínimo de 1 <i>Salmonella</i> /g)
Todas	60	40	2
Inspecionado	30	22	1
Não inspecionado	30	18	1
χ^2		1.2	0.0
<i>p</i>		0.273	1.000

χ^2 = teste chi-quadrado; *p* = nível de significância. Para todas as comparações o grau de liberdade foi 1.

Tabela 3. Frequências de amostras de carcaças de frango inspecionadas ou não inspecionadas considerando diferentes níveis de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene.

MO indicador/Inspeção	n	Nível de Contaminação (log UFC/g)				
		> 3.0	> 4.0	> 5.0	> 6.0	> 7.0
Aeróbios mesófilos						
Inspecionado	30	26	22	16	8	1
Não inspecionado	30	30	30	25	8	1
χ^2		4.29	9.23	6.24	0.00	0.00
<i>P</i>		0.038	0.002	0.012	1.000	1.000
Enterobacteriaceae						
Inspecionado	30	22	13	6	3	0
Não inspecionado	30	28	18	2	0	0
χ^2		4.32	1.67	2.31	3.16	-
<i>P</i>		0.038	0.196	0.129	0.076	-
Coliformes Totais						
Inspecionado	30	13	3	0	0	0
Não inspecionado	30	15	1	0	0	0
χ^2		0.27	1.07	-	-	-
<i>P</i>		0.605	0.301	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>						
Inspecionado	22	7	0	0	0	0
Não inspecionado	18	3	0	0	0	0
χ^2		1.21	-	-	-	-
<i>P</i>		0.271	-	-	-	-

χ^2 = teste chi-quadrado; p = Nível de significância. Para todas as comparações o grau de liberdade foi 1.

(ausência em 80% das análises) (USA, 2003)

Em relação a micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango, apesar de não serem exigidos parâmetros específicos para os diversos grupos usualmente encontrados nesses produtos, esses grupos podem determinar importantes processos de deterioração quando presentes em altos níveis, além de serem indicativos de condições inadequadas de produção e presença de patógenos (Tsola et al., 2008; Jay et al., 2005; Alvarez-Astorga et al., 2002). Para aves, apenas algumas orientações são definidas, como um limite máximo de 6.0 log UFC/g de contaminação por AM e de 3.0 log UFC/g por EC, especificamente na Espanha. Na França, a recomendação é que contaminação por AM em aves não supere o valor de 5.7 log UFC/g e a contaminação por EC não supere o valor de 4.0 log UFC/g. Situação similar ocorre nos EUA, onde alguns estados determinam limites máximos de contaminação em carcaças de frangos e seus produtos derivados (USA, 2003; Álvarez-Astorga et al., 2002). Independente dos parâmetros oficiais, quando a contaminação microbiana total varia entre 6.0 e 7.0 log UFC/cm², os produtos cárneos possuem odor perceptível, e a partir de 8.0 log UFC/cm² passam a apresentar formação de limo, além de alterações de cor e consistência (Gill, 1998). Assim, esses níveis de contaminação são importantes referências para se controlar a qualidade de produtos cárneos, inclusive carcaças de frango.

As amostras ainda foram agrupadas considerando as diferentes faixas de contaminação por cada grupo de micro-organismo indicador de higiene, e as frequências obtidas comparadas (Tabela 3). Para AM, diferenças significativas de contaminação ($p < 0.05$) foram encontradas em faixas de contaminação acima de 3.0, 4.0 e 5.0 log UFC/g. Em todos esses níveis, as carcaças de frango não inspecionadas apresentaram maior frequência de contaminação. Oito amostras de carcaças inspecionadas e oito não inspecionadas apresentaram contagens de AM acima de 6.0 log UFC/g, parâmetro de qualidade e segurança sugerido por Álvarez-Astorga et al. (2002). Para EB houve diferença significativa apenas para contaminações acima de 3.0 log (Tabela 3), sendo que as carcaças não inspecionadas apresentaram maior frequência de contaminação. Não houve diferença significativa entre as frequências de amostras inspecionadas e não inspecionadas considerando as diferentes faixas de contaminação de coliformes totais (Tabela 3). Em relação à EC, sete amostras inspecionadas e três não inspecionadas apresentaram contagens superiores a 3.0 log UFC/g (Tabela 3), limite superior tolerado para carcaças de frango nos EUA (USA, 2003), e sugerido como referência de contaminação por Álvarez-Astorga et al. (2002). Nenhuma das amostras analisadas

neste estudo apresentou contagem de EC superior a 4.0 log UFC/g (Tabela 3), valor sugerido como referência de contaminação na França (Álvarez-Astorga et al., 2002).

Não existem trabalhos na literatura que comparem a qualidade e segurança microbiológica em carcaças de frango submetidas ou não fiscalização oficial, e os resultados obtidos mostram que carcaças de frango inspecionadas e não inspecionadas não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de contaminação por AM, EB e CT. Ainda, apresentaram freqüências similares de resultados positivos para EC e *Salmonella* spp. Entretanto, diferenças significativas foram observadas em relação a AM, com maiores freqüências de carcaças de frango não inspecionadas com altos níveis de contaminação, acima de 4.0 e 5.0 log UFC/g.

Apesar de não terem sido encontradas muitas diferenças entre o perfil de contaminação microbiológica entre as carcaças submetidas e não a inspeção oficial é necessário ressaltar a importância desse procedimento na produção de frango. A fiscalização oficial da produção de frangos não se restringe apenas a qualidade e segurança microbiológica final dos produtos destinados ao consumo humano, mas também vários outros parâmetros de qualidade desde a produção dos animais até a linha de abate, fundamentais para garantia da qualidade dos produtos finais. A sanidade dos animais abatidos e a presença de resíduos químicos, por exemplo, são pontos que devem ser controlados e fundamentais para garantia da qualidade e segurança dos produtos, e contemplados por programas oficiais do MAPA e da ANVISA no Brasil (Brasil, 2003a; Brasil, 2003b; Brasil, 2003c). Ainda, a presença de resíduos químicos pode causar interferência direta nos níveis de contaminação microbiológica, além de representarem um risco para saúde pública (Andrée et al., 2010).

Referencias bibliográficas.

- ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e exportadores de frango. *Estatística*. <<http://www.abef.com.br/>>. Acessado em 01/09/2010.
- Altekruse A.F.; Bauer N.; Chanlongbutra A.; DeSagun R.; Naugle A.; Schlosser W.; Umholtz R.; White P. *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000-2005. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 12, 2006.
- Alvarez-Astorga, M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Moreno, B.; Garcia-Fernandez, M. C. Microbiological quality of retail chicken by- products in Spain. *Meat Science*, v. 62, p.45-50, 2002.

- Alvarez, J.; Sota, M.; Vivanco, A.; Perales, I.; Cisterna, R.; Rementeria, A.; and Garaizar, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* v.42, p.1734-1738, 2004.
- Andrée, S.; Jira, W.; Schwind, K.-H.; Wagner, H.; Schwagele, F. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*, v.86, p. 38-48, 2010.
- Borch, E.; Nesbakken, T.; Christensen, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal Food Microbiology*, n.30, p.9-25, 1996.
- Brasil. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário da União, Brasília 1952.
- Brasil. Legislação federal. Dispõe sobre inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 04/09/1997. Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial da União*, 08/09/1997, Seção 1, p. 19697, 1997.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12 de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 10 de janeiro de 2001.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 70, de 6 de outubro de 2003. Instituir o Programa de Redução de Patógenos. Diário Oficial da União, 10/10/2003 (a).
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC no 253, de 16 de setembro de 2003. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo. Diário Oficial da União, 18/09/2003 (b).
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 2376, de 15 de dezembro de 2003. Aprovar o Regimento Interno da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Diário Oficial da União, 17/12/2003 (c).

- Brasil. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 40 de 12/12/2005. Aprova os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da Salmonella na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos. Diário Oficial da União, 16/12/2005 ,Seção 1 , P. 70, 2005 (a).
- Brasil. Secretária de Vigilância e Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999- 2004. Ano 5, no 06, 28/12/2005 (b).
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em frango - PREBAF*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2008.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível: URL <http://www.portal.anvisa.gov.br>. Acesso: 25/11/2010.
- Capita, R.; Prieto, M.; Alson-Calleja, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, v.67, n.6, p.1303-1308, 2004.
- Cason, J.A.; Berrang, M.E.; Buhr, R.J.; Cox, N.A. Effect of prechill fecal contamination on number of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.67, n.9, p.1829-1833, 2004
- EC - European Community. Commission Regulation. EC no 1441/2007 de 5 de dezembro de 2007 que altera o regulamento (CE) no 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. Official Journal of the European Union. L 322, , p. 12 – 29. 7/12/2007.
- Galán, J.E.; Ginocchio, C.; and Costeas, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology* v.174, p.4338-4349, 1992.
- Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Daube, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, v.71, n.1, p.35-45, 2008.
- Gill, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: Davies, A.; Board, R. (Eds.) *The Microbiology of Meat and Poultry*. London: Blackie Academic and Professional, p.118-157, 1998.
- Gill, C.O.; Badoni, M.; Moza, L.F.; Barbut, S.; Griffiths, M.W. Microbiological Sampling of Poultry Carcass Portions by Excision, Rinsing, or Swabbing. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 12, p. 2718-2720, 2005 (a).

- Gill, C.O.; Badoni, M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rising, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology*, v.27, p.101-107, 2005 (b).
- Gill, C.O.; Moza, L.F.; Badoni, M.; Barbut, S. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant. *International Journal of Food Microbiology*, v. 110, p. 187-193, 2006.
- Hugas, M.; Tsigarida, E., Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. *Meat Science*, v.78, p.43-52, 2008.
- Hutchison, M.L.; Walters, L.D.; Mead, G.C.; Howell, M.; Allen, V.M. An assessment of sampling methods and microbiological hygiene indicators for process verification in poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.69, n.1, p.145-153, 2006.
- ISO - International Organization for Standardization. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed, 2002.
- Jay, J.M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7 ed., New York: Springer. 2005. 790pp. 2005.
- Jorgensen, F.; Bailey, R.; Williams, S.; Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J.; Frost J.A.; Ward, L.; Humphrey, T.J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp., on raw, whole chickens in relations to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*, n.76, p.151-164, 2002.
- Kotula, K.L.; Pandya Y. Bacterial Contamination of Broiler Chickens before Scalding. *Journal of Food Protection*, v.58, n.12, p.1326-1329, 1995.
- Luber, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs – which risks need to be managed first. *International Journal of Food Microbiology*, v.134, p.21-28, 2009.
- Sakhare, P.Z.; Sachindra, N.M.; Yashoda, K.P.; Narasimha Rao, D.; Efficacy of intermittent decontamination treatments during processing in reducing the microbial load on broiler chicken carcass. *Food Control*, v.10, p.184-194, 1999.
- Sumner J.; Raven G.; Givney R. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of *Salmonella* or of salmonellosis? *International Journal of Food Microbiology*, v.92, p.199-205, 2004

- Tessari, E.N.C.; Cardoso, A.L.S.P.; Castro, A.G.M.; Zanatta, G.F. *Salmonella* Enteritidis prevalency in broiler carcass industrially processed. *Revista Higiene Alimentar*, v.17, n.107, p.52-55, 2003.
- Tsola E.; Drosinos E.H.; Zoiopoulos, P. Impacto f poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, v.19, p.423-431, 2008.
- USA - USDA, 2003. Code of Federal Regulations, Title 9 (Animals and Animals Products), Chapter III (Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture), Part 381 (Poultry Products Inspection Regulations). Revised at 01 January 2003, available at http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/9cfr381_03.html
- Wang, L.; Shi, L.; Alam, M.J.; Geng, Y.; Li, L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*, v.41, p.69-74, 2008.
- Whyte, P.; McGill, K.; Monahan, C.; Collins, J.D. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. *Food Microbiology*, v.21, p.59-65, 2004.

ARTIGO 2. Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas para obtenção de unidade analítica em carcaças de frango para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

Resumo

Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas para obtenção de unidade analítica em carcaças de frango para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

A técnica de amostragem utilizada para obtenção de amostras de alimentos é fundamental para o sucesso das análises microbiológicas. Metodologias destrutivas e não destrutivas são amplamente utilizadas em carcaças animais, apresentando vantagens e desvantagens. Visando a comparação de técnicas destrutivas e não destrutivas de amostragem, 60 carcaças de frango resfriadas foram analisadas por quatro diferentes técnicas: lavagem superficial, excisão de tecidos, swab superficial e excisão de pele. As amostras foram retiradas em locais próximos e distantes da região cloacal das carcaças. Todas as amostras foram submetidas a enumeração de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, coliformes totais e *Escherichia coli*, e comparadas estatisticamente ($P < 0.05$). A excisão de tecidos foi a técnica que permitiu maior recuperação dos micro-organismos indicadores de higiene pesquisados, com diferenças estatísticas em relação às demais técnicas para coliformes totais e *E. coli* ($P < 0.05$). Não foram observadas diferenças relevantes entre amostragens próximas ou distantes da cloaca ($P > 0.05$). Considerando os resultados obtidos, foi possível a determinação de correlações significativas ($P < 0.05$) entre todas as técnicas de amostragem avaliadas, para a maioria dos micro-organismos indicadores de higiene avaliados (exceto para *E. coli*, entre excisão de pele e excisão de tecidos). Os resultados obtidos evidenciam a equivalência entre diferentes técnicas de amostragem de carcaças de frango, o que permite a comparação adequada de dados microbiológicos.

Palavras-chave: amostragem, frango, micro-organismos indicadores de higiene.

Abstract

Comparison of destructive and non-destructive chicken carcass sampling techniques for hygiene indicator microorganism enumeration

The sampling technique used to obtain food samples is fundamental to the success of microbiological analysis. Destructive and non-destructive methodologies are widely employed in animal carcass sampling with advantages and disadvantages. In this study we compared destructive and non-destructive techniques for carcass sampling. 60 fresh chicken carcasses were analyzed by four different techniques: rinsing, tissue excision, superficial swabbing and skin excision. Samples were collected both close to and far from the cloacae region. All samples were submitted for enumeration of mesophilic aerobes, Enterobacteriaceae, total coliforms and *Escherichia coli*, and compared statistically ($P < 0.05$). We found that tissue excision allowed the greatest recovery of hygiene indicator microorganisms, being significantly higher than all other techniques for total coliforms and *E. coli* ($P < 0.05$). No significant differences were observed between samples collected close to or far from the cloacae region ($P > 0.05$). Based on our results, we identified significant correlations ($P < 0.05$) between all sampling techniques evaluated for most of the hygiene indicators assayed (with the exception of *E. coli* in relation to skin excision and tissue excision). Our results demonstrate the equivalence of different sampling techniques of chicken carcasses, and allow for proper comparison of microbiological data.

Keywords: sampling, chicken, hygiene indicators microorganisms.

Introdução

O monitoramento microbiológico de indicadores de higiene em carcaças de animais durante o abate é um procedimento fundamental para a garantia da qualidade e segurança dos produtos finais destinados ao consumo humano (Ghafir et al., 2008; Palumbo et al., 1999). A pesquisa sistemática desses micro-organismos é preceito básico de diversos programas de controle de qualidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, indicando as condições higiênicas em toda a cadeia de produção (Gill et al., 2006). Ainda, a pesquisa de grupos específicos de micro-organismos pode indicar a presença de patógenos, representando importantes ferramentas para controle adequado da contaminação e garantia da segurança dos produtos finais (Rodrigues et al., 2008; Capita et al., 2004).

Um ponto crucial para a precisão dos dados microbiológicos de carcaças animais é a escolha do procedimento ideal e adequado de amostragem (Snijders et al., 1984). Vários procedimentos como excisão de tecido, swab de carcaça, lavagem superficial de carcaça e excisão de pele, podem ser adotados por frigoríficos e órgãos oficiais de fiscalização e controle, sendo usualmente classificados como destrutivos e não-destrutivos (Capita et al., 2004). Pelos procedimentos destrutivos há obrigatoriamente a excisão de porções das carcaças a serem analisadas, comprometendo a sua integridade. Entretanto, esses procedimentos são capazes de recuperar maiores quantidades dos micro-organismos associados a essas carcaças, sendo usualmente considerados mais precisos para definição do nível de contaminação microbiológica (Gill et al., 2005; Pearce & Bolton, 2005). Por outro lado, a adoção de procedimentos não-destrutivos mantém a integridade das carcaças analisadas, preservando suas características naturais e determina um aproveitamento integral para a produção de cortes específicos. Como desvantagens, alguns estudos demonstram menor capacidade de recuperação de grupos microbianos específicos, o que pode subestimar a real contaminação das carcaças e comprometer programas de controle de qualidade e segurança (Gill & Badoni, 2005; Gill et al., 2005).

Em carcaças de aves e seus produtos derivados, vários grupos de micro-organismos indicadores de higiene e sugestivos da presença de patógenos podem ser pesquisados (Ghafir et al., 2008; Alvarez-Astorga et al., 2002). Entretanto, apenas a enumeração de coliformes usualmente é exigida em legislações de diversos países, além da pesquisa de *Salmonella* spp (EC, 2007; Álvarez-Astorga et al., 2002; Brasil, 2001). Várias metodologias também são utilizadas para a amostragem de carcaças de aves,

tanto destrutivas como não-destrutivas. Particularidades de carcaças de aves, como tamanho e peso, facilitam a adoção de procedimentos não-destrutivos, como a lavagem superficial e esfregaços superficiais (Capita et al., 2004; Cason et al., 2004).

Considerando que diversas formas de amostragem são utilizadas em estudos científicos e oficialmente adotadas por órgãos fiscalizadores de diferentes países, é necessário o estabelecimento da equivalência entre esses procedimentos. Apenas considerando essas equivalências é possível a comparação adequada de dados microbiológicos obtidos por diferentes procedimentos de amostragem (Capita et al., 2004). Ainda, essas comparações podem ser utilizadas como referência na escolha de qual procedimento é o mais adequado para o monitoramento microbiológico de carcaças de animais, considerando particularidades desses produtos e objetivos de qualidade e segurança de uma indústria ou mesmo país (Gill & Badoni, 2005).

O objetivo desse trabalho foi comparar metodologias destrutivas (excisão de tecidos e excisão de pele) e não-destrutivas (swab e lavagem superficial) de amostragem de carcaças de frango para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, além de estabelecer uma equivalência entre esses procedimentos.

Material e Métodos

Coleta de carcaças de frango

Um total de 60 carcaças de frango resfriadas, “in natura”, foi adquirido em estabelecimentos comerciais no município de Viçosa e região, Minas Gerais, Brasil. Cada carcaça foi coletada em sua embalagem original, acondicionada em recipiente isotérmico e mantida sob refrigeração, por aproximadamente duas horas, até o momento das análises laboratoriais.

Procedimentos de amostragem das carcaças de frango e diluições

Em condições assépticas, cada carcaça foi dividida em duas metades iguais a partir de secção ao longo da coluna vertebral com faca estéril (Figura 1). Uma metade foi utilizada para obtenção de amostra por lavagem superficial (procedimento não-destrutivo), conforme USDA/FSIS (2008), com alterações. A metade da carcaça foi acondicionada em uma bag estéril, pesada e adicionada da mesma quantidade (em volume) de água peptonada 0,1% (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) estéril, sendo o conjunto massageado manualmente por 5 minutos. O homogenato obtido foi

acondicionado em um frasco estéril, sendo considerado como concentração final de 1mL = 1g (Quadro 1).

A outra metade foi submetida à amostragem por dois procedimentos destrutivos (excisão de tecidos e excisão de pele) e um não-destrutivo (swab de superfície), conforme Gill et al. (2006). As porções peitoral e dorsal da meia-carcaça foram divididas em seis áreas delimitadas de 25 cm² (5 x 5 cm) com moldes estéreis, que foram utilizados como referência para obtenção de amostras pelos procedimentos citados (Figura 1). Para obtenção das amostras por cada procedimento, duas áreas eram aleatoriamente selecionadas considerando ambas as porções da meia-carcaça, totalizando 50 cm² ou g, além de proximidade ou não à região cloacal (Figura 1).

A amostragem por swab (não-destrutiva) ocorreu por esfregação de esponjas estéreis previamente umedecidas (5 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid)) nas áreas selecionadas, e acondicionadas em bags estéreis, adicionadas de 45mL de água peptona estéril 0,1% (Oxoid) e homogeneizadas em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de 1 mL = 1 cm² (Quadro 1).

A amostragem por excisão de tecido (destrutiva) ocorreu por retirada de fragmentos de pele e tecido muscular das áreas selecionadas com bisturi e pinças estéreis, e acondicionados em bags estéreis até atingir o peso de 25g. Em seguida, 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid) foram adicionados e homogeneizados em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de 1 mL = 0.1 g (diluição 1:10) (Quadro 1).

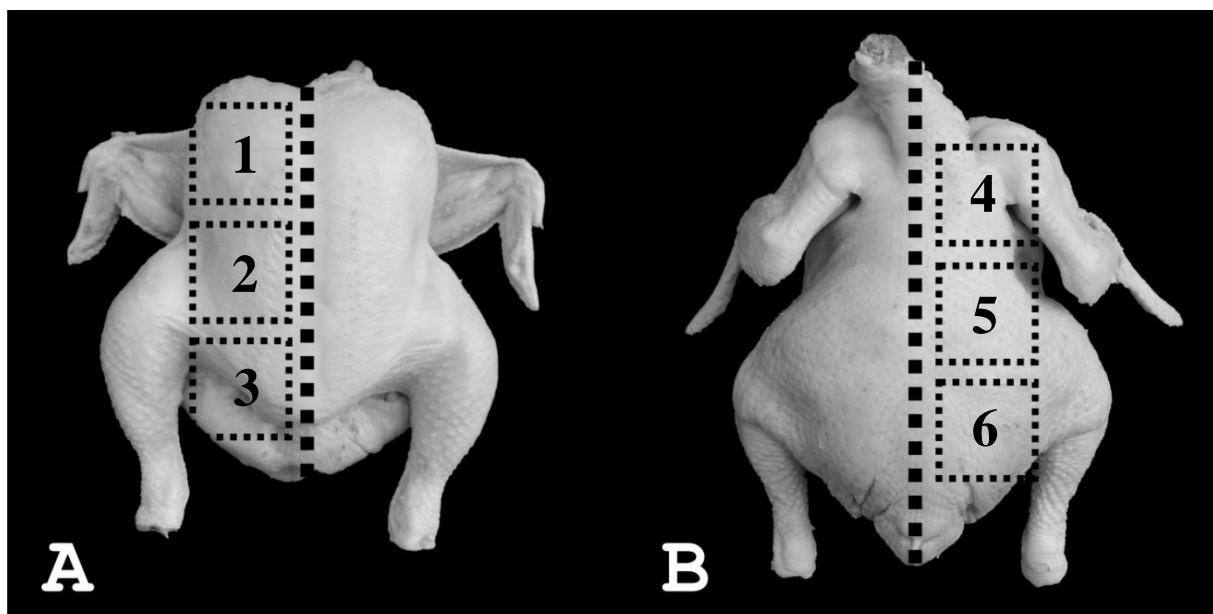


Figura 1. Visão Frontal (A) e Dorsal (B) de uma carcaça típica de frango, demonstrando a divisão da carcaça em duas metades (linha pontilhada marcando o meio da carcaça).

Em uma das metades da carcaça foi utilizado o método lavagem superficial. A outra metade foi dividida em 6 áreas (quadrados pontilhados) e foram amostrados por excisão de tecido, excisão de pele e esfregaço superficial de pele. Os quadrados enumerados de 1, 2, 4 e 5 foram considerados distantes da cloaca e os quadrados 3 e 6 foram considerados próximos a cloaca.

A amostragem por excisão de pele (destrutiva) ocorreu por retirada da pele com bisturi e pinça estéreis das áreas selecionadas, totalizando 50 cm² sendo em seguida acondicionadas em bags estéreis com 50 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid), e submetidas à homogeneização em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de 1 mL = 1 cm².

Todos os homogenatos obtidos foram submetidos à diluição seriada em escala decimal, utilizando como diluente água peptonada 0.1% (Oxoid), e utilizados para enumeração de micro-organismos indicadores de higiene (Quadro 1).

Quadro1. Relação entre técnicas de coleta de amostras e suas respectivas áreas, volume de diluentes e concentração final.

Método/ Características	Área ou Peso amostrado	Volume de Diluyente	Concentração final
Enxágue superficial de Carcaça	½ carcaça	Volume igual ao peso da ½ carcaça	1 g/ 1 ml
Swab de carcaça	50 cm ²	50 ml	1 cm ² / 1 ml
Excisão de tecido	25g	225 ml	0,1 g/ 1 ml
Excisão de pele	50 cm ²	50 ml	1 cm ² / 1 ml

Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene

As diluições obtidas de cada carcaça de frango pelos quatro procedimentos de amostragem foram semeadas em placas Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) para enumeração de diferentes grupos de micro-organismos indicadores de higiene. Aeróbios mesófilos foram enumerados em placas Petrifilm™ Aerobic Count (3M Microbiology) incubadas a 35 °C por 24-48h, quando colônias vermelhas eram enumeradas e o resultado final expresso como unidades formadoras de colônias por g ou cm² (UFC/g ou cm²). Para enumeração de enterobactérias foram utilizadas placas Petrifilm™ Enterobacteriaceae (3M Microbiology), com incubação a 35 °C por 24-48h, quando colônias amarelas, associadas ou não a gás, e colônias associadas a gás eram enumeradas, com resultado final expresso em UFC/g ou cm². Coliformes totais e *Escherichia coli* foram enumerados em placas Petrifilm™ Escherichia coli (3M Microbiology), com incubação a 35 °C por 24-48h, quando colônias associadas a gás eram enumeradas como coliformes e colônias azuis associadas a gás como *E. coli*, e os resultados finais expressos em UFC/g ou cm².

Análise dos dados

Todas as contagens obtidas foram convertidas em log₁₀ e avaliadas quanto a normalidade e homogeneidade. Os valores obtidos foram comparados por Kruskal Wallis (p < 0.05) para verificação de diferenças significativas entre os procedimentos de amostragem, com comparações pareadas por Mann-Whitney (p < 0.05). As mesmas análises foram realizadas para verificação de diferenças significativas num mesmo procedimento de amostragem, considerando os locais de retirada de fragmentos ou swab

nas carcaças de frango (próximos ou distantes da cloaca). Finalmente, as contagens obtidas foram comparadas por correlação Spearman ($p < 0.05$) para verificação da equivalência entre os diferentes procedimentos de amostragem avaliados. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e XLSTAT 2009.1.02 (Addinsoft USA, New York, NY, USA).

Resultados e Discussão

Uma análise descritiva dos dados microbiológicos obtidos a partir dos diferentes procedimentos de amostragem das carcaças de frango analisadas é apresentada na Tabela 1. Considerando esses resultados, pode-se perceber que a metodologia de excisão de tecidos foi capaz de recuperar maiores contagens de micro-organismos indicadores de higiene, quando comparada as demais. Essa maior capacidade de recuperação por esse procedimento destrutivo já foi verificado em outros estudos, mesmo considerando carcaças de outras espécies animais (Capita et al., 2004; Gill et al., 2001; Gill & Jones, 2000).

De forma geral, os dados não apresentaram uma distribuição normal, o que determinou a aplicação de métodos não paramétricos para a comparação entre os protocolos de amostragem avaliados. As comparações entre os valores obtidos pelas diferentes técnicas avaliadas e considerando os grupos de micro-organismos pesquisados são apresentados na Tabela 2. Numa análise geral, independente da unidade final dos resultados (ufc/g ou cm^2), a excisão de tecidos foi capaz de recuperar maiores contagens, sendo estatisticamente superior as demais técnicas para coliformes totais e *E. coli*. Para aeróbios mesófilos e enterobactérias, entretanto, a excisão de tecidos não apresentou diferenças significativas apenas em relação à lavagem superficial, método não-destrutivo e com resultados finais em ufc/g. Vários estudos apresentam resultados semelhantes aos observados, sendo a excisão de tecidos a técnica capaz de determinar maior recuperação de micro-organismos indicadores de higiene (Hutchison et al., 2005; Miraglia et al., 2005).

Os resultados observados podem estar relacionados à capacidade de associação dos micro-organismos com os tecidos das carcaças, sendo necessária a utilização de métodos destrutivos para garantir adequadamente a remoção (Capita et al., 2004; Werlein, 2001; Gill & Jones, 2000; Dorsa et al., 1996). Alguns estudos consideram a lavagem superficial até mais eficiente para remoção de micro-organismos quando presentes em baixas concentrações, como *E. coli* (Gill et al., 2005; Werlein, 2001).

Outro fator que pode comprometer a eficiência de remoção dos micro-organismos de uma amostra é a homogeneização. Preferencialmente essa etapa deve ser padronizada, sendo realizada em equipamentos adequados para esse fim. Entretanto, a homogeneização por equipamentos é inviável para algumas amostras e protocolos de amostragem (lavagem superficial), sendo necessária a manipulação direta pelos analistas, o que pode determinar a baixa recuperação de alguns grupos microbianos (Russel et al., 1997). Os resultados similares entre excisão de tecidos e lavagem superficial para enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias (Tabela 2) indica a viabilidade de se utilizar essa metodologia não-destrutiva para a recuperação desses grupos de micro-organismos no controle de qualidade de carcaças de frango (Capita et al., 2004).

Tabela 1. Parâmetros estatísticos de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango frescas obtidas por diferentes técnicas de amostragem.

MO Indicador/ Técnica de amostragem	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Variância	Mínimo	Máximo
<i>Aeróbios Mesófilos</i>							
Lavagem superficial (log UFC/g)	60	5,30	0,94	0,12	0,89	3,00	6,68
Excisão de tecido (log UFC/g)	56	5,56	0,81	0,11	0,66	4,00	7,18
Excisão de pele (log UFC/cm ²)	60	5,15	0,89	0,11	0,79	3,30	6,60
Swab de pele (log UFC/cm ²)	59	5,06	1,01	0,13	1,02	3,00	6,62
<i>Enterobacteriaceae</i>							
Lavagem superficial (log UFC/g)	59	3,91	0,86	0,11	0,74	2,00	5,53
Excisão de tecido (log UFC/g)	54	4,22	0,86	0,12	0,74	2,00	6,29
Excisão de pele (log UFC/cm ²)	59	3,82	0,80	0,10	0,64	2,00	5,47
Swab de pele (log UFC/cm ²)	55	3,76	0,92	0,12	0,85	2,00	5,61
<i>Coliformes Totais</i>							
Lavagem superficial (log UFC/g)	60	2,65	0,63	0,08	0,40	1,48	4,15
Excisão de tecido (log UFC/g)	56	3,10	0,59	0,08	0,35	2,00	4,46
Excisão de pele (log UFC/cm ²)	57	2,55	0,60	0,08	0,36	1,00	3,93
Swab de pele (log UFC/cm ²)	59	2,38	0,68	0,09	0,47	1,00	4,03
<i>Escherichia coli</i>							
Lavagem superficial (log UFC/g)	59	2,30	0,60	0,08	0,36	1,00	3,75
Excisão de tecido (log UFC/g)	40	2,67	0,51	0,08	0,26	2,00	3,76
Excisão de pele (log UFC/cm ²)	55	2,16	0,64	0,09	0,41	1,00	3,41
Swab de pele (log UFC/cm ²)	46	1,99	0,60	0,09	0,36	1,00	3,72

Tabela 2. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens por micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango resfriadas obtidas por diferentes técnicas de amostragem.

MO Indicador	Excisão de tecido ufc/g	Lavagem superficial ufc/g	Excisão de pele ufc/cm ²	Swab de pele ufc/cm ²	H*	P
Aeróbios Mesófilos	5,44 (5,00 - 6,21) ^a	5,32 (4,96 - 6,08) ^{a, b, c}	5,18 (4,48 - 5,92) ^b	5,20 (4,51 - 6,00) ^{b, c}	8.08	0.04
Enterobacteriaceae	4,17 (3,63 - 4,60) ^a	3,89 (3,48 - 4,53) ^{a, b, c}	3,84 (3,30 - 4,18) ^b	3,48 (3,08 - 4,45) ^{b, c}	9.98	0.02
Coliformes Totais	2,99 (2,70 - 3,60) ^a	2,59 (2,16 - 3,06) ^b	2,60 (2,11 - 2,95) ^{b, c}	2,26 (2,00 - 2,75) ^c	35.66	0.00
<i>Escherichia coli</i>	2,60 (2,30 - 3,06) ^a	2,26 (1,85 - 2,70) ^b	2,20 (1,70 - 2,61) ^{b, c}	2,00 (1,60 - 2,30) ^c	26.56	0.00

* Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). Valores em uma mesma linha com letras sobscritas diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney U ($P < 0.05$).

Swab de pele e excisão de pele obtiveram resultados estatisticamente semelhantes para todos os grupos de micro-organismos pesquisados (Tabela 2). Entretanto, esses procedimentos apresentaram menor contaminação, havendo diferenças significativas quando comparados a lavagem superficial e excisão de tecidos, cujos resultados finais foram expressos em ufc/g. Swab de pele foi aquela que obteve os menores valores de contaminação. Esses resultados indicam diferenças significativas entre análises que determinam a contaminação superficial (por áreas, como cm²) ou geral (massa específica, peso) de carcaças de aves.

Apesar de serem bastante utilizadas em estudos científicos e protocolos oficiais, amostragens que determinam apenas a contaminação superficial de carcaças possuem algumas limitações (Zweifel et al., 2005; Pearce & Bolton, 2005; EC, 2001). A principal justificativa para a sua aplicação é a necessidade de preservar a integridade das carcaças animais, porém esse objetivo não é atingido em situações específicas (excisão de pele).

Em relação à amostragens por swab de superfícies, a natureza do material utilizado para coleta é fator determinante para a retirada dos micro-organismos aderidos, sendo considerados como melhor opção os produzidos com materiais mais abrasivos (Gill et al., 2001). Outros estudos indicam grande variedade dos resultados obtidos por esse procedimento, causada provavelmente por resíduos de antimicrobianos nas esponjas de coleta ou mesmo diferenças entre homogenatos utilizados (Gants, 1997; Daley et. al., 1995; Llbres and Rose, 1989). No presente estudo, as esponjas utilizadas para a amostragem superficial das superfícies das carcaças de frango não possuíam resíduos de antimicrobianos, e o procedimento de diluição e obtenção homogenato inicial foi completamente padronizado.

Outro fator considerado importante na coleta de amostras de carcaças de animais é a escolha de pontos próximos ou distantes de regiões potencialmente contaminadas, como a região cloacal em aves (Cason & Berrang, 2002; Palumbo et al. 1999; Kotula & Pandya, 1995). Considerando essa variável, os resultados obtidos por cada procedimento de amostragem (exceto a lavagem superficial) foram agrupados e comparados estatisticamente (Tabela 3).

Não foram observadas diferenças significativas entre amostragens próximas ou distantes da cloaca, independente do procedimento adotado de coleta e grupo de micro-organismo pesquisado. Para carne vermelha, é bem estabelecido que alguns pontos da carcaça como peito e pescoço e lombo são mais susceptíveis a contaminação microbiana

devido às etapas de esfolagem e evisceração no abate (Grau, 1986). No abate de aves, o processo de evisceração tende a contaminar a carcaça de maneira semelhante, porém as diversas etapas de lavagem determinam uma distribuição uniforme da contaminação microbiana por toda a carcaça (Mead et al., 1994).

Entretanto, quando todas as contagens foram comparadas entre si, independente da técnica de amostragem, diferenças significativas foram observadas entre diferentes protocolos quando consideradas amostras próximas ou distantes da cloaca (Tabela 4), porém com um padrão de diferença semelhante ao previamente observado (Tabela 2). As diferenças observadas foram relacionadas a coliformes totais e *E. coli*, cujos resultados foram significativamente superiores quando obtidos por excisão de tecidos distantes para coliformes totais ou próximos para *E. coli* da cloaca, quando comparados aos demais. A interferência de regiões amostradas em carcaças na recuperação de micro-organismos indicadores de higiene já foi verificada em estudo com suínos (Palumbo et al., 1999), onde foi identificada diferenças significativas nas contagens de amostras superficiais da região do pernil quando comparadas a outras regiões (barriga e mandíbula).

Tabela 3. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango e obtidas próximas ou não a região cloacal por diferentes técnicas de amostragem.

Técnica de amostragem	Aeróbios Mesófilos	Enterobacteriaceae	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>
Swab de pele				
Próximo a cloaca	5,26 (4,59 - 6,00)	3,48 (3,08 - 4,45)	2,23 (2,00 - 2,80)	2,00 (1,60 - 2,30)
Distante da cloaca	4,95 (3,99 - 5,73)	3,61 (3,00 - 4,25)	2,25 (2,00 - 2,71)	1,95 (1,60 - 2,30)
U*	469,5	370,5	435	247,5
P	0,449	0,904	0,823	0,799
Excisão de pele				
Próximo a cloaca	5,06 (4,44 - 5,99)	3,85 (3,31 - 4,26)	2,44 (2,11 - 2,87)	2,20 (1,70 - 2,48)
Distante da cloaca	5,32 (4,84 - 5,67)	3,78 (3,17 - 4,08)	2,69 (2,14 - 3,09)	2,25 (1,78 - 2,70)
U*	408,5	458,5	322	328,5
P	0,729	0,494	0,265	0,559
Excisão de tecido				
Próximo a cloaca	5,41 (4,94 - 6,46)	4,16 (3,48 - 4,69)	2,95 (2,78 - 3,41)	2,65 (2,30 - 3,11)
Distante da cloaca	5,60 (5,14 - 6,03)	4,17 (3,70 - 4,54)	3,15 (2,70 - 3,60)	2,40 (2,30 - 3,00)
U*	411,5	361	341,5	197,5
P	0,535	0,804	0,591	0,667

* Teste Mann-Whitney U.

Tabela 4. Valores medianos (25 e 75% quartis) de contagens de micro-organismos indicadores de higiene em carcaças de frango e obtidas por diferentes técnicas de amostragem e próximas ou não a região cloacal.

Técnica de amostragem	Local de coleta	Aeróbios Mesófilos	Enterobacteriaceae	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>
Swab de pele	Próximo a cloaca	5,26 (4,59 - 6,00)	3,48 (3,08 - 4,45)	2,23 (2,00 - 2,80) ^b	2,00 (1,60 - 2,30) ^c
	Distante da cloaca	4,95 (3,99 - 5,73)	3,61 (3,00 - 4,25)	2,25 (2,00 - 2,71) ^b	1,95 (1,60 - 2,30) ^c
Excisão de pele	Próximo a cloaca	5,06 (4,44 - 5,99)	3,85 (3,31 - 4,26)	2,44 (2,11 - 2,87) ^b	2,20 (1,70 - 2,48) ^c
	Distante da cloaca	5,32 (4,84 - 5,67)	3,78 (3,17 - 4,08)	2,69 (2,14 - 3,09) ^b	2,25 (1,78 - 2,70) ^{b, c}
Excisão de tecido	Próximo a cloaca	5,41 (4,94 - 6,46)	4,16 (3,48 - 4,69)	2,95 (2,78 - 3,41) ^a	2,65 (2,30 - 3,11) ^a
	Distante da cloaca	5,60 (5,14 - 6,03)	4,17 (3,70 - 4,54)	3,15 (2,70 - 3,60) ^a	2,40 (2,30 - 3,00) ^{a, b}
H*		9,195	10,544	34,977	29,099
P		0,103	0,061	< 0,0001	< 0,0001

*Teste Kruskal-Wallis (P < 0.05). Valores em uma mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney U (P < 0.05).

Considerando as diferenças observadas entre as contagens pelos diferentes procedimentos, e a viabilidade de utilização dependendo de particularidades das carcaças e objetivos de qualidade e segurança, os dados obtidos foram correlacionados a fim de se obter equivalentes entre as técnicas avaliadas (Tabelas 5, 6, 7 e 8). Essas associações permitem verificar se as correlações entre as contagens obtidas por diferentes procedimentos de amostragem são significativas, permitindo assim estabelecer uma equivalência entre os mesmos e comparação adequada da qualidade microbiológica. Baseado nessa análise verificou-se que na maioria das comparações as correlações observadas foram significativas, exceto para enumeração de *E. coli* em amostragem por excisão de tecidos e excisão de pele.

Apesar da grande quantidade de estudos comparando diferentes protocolos de amostragem de carcaças animais (Cox et al., 2010; Miraglia et al., 2005; Gill & Badoni, 2005; Gill et al., 2005), o estabelecimento dessas correlações muitas vezes é dificultado pelo grande número de variáveis que interferem nos resultados dos diferentes métodos (Hutchison et al., 2006; Capita et al., 2004; Bolton, 2003). Devido a esse grande número de variáveis, Hutchison et al. (2005) não encontraram correlação entre resultados obtidos por swab de pele e excisão de tecidos. O estabelecimento de equivalência entre as diferentes técnicas de coleta de amostras é uma importante referência para as indústrias escolherem o protocolo ideal a ser adotado para o seu sistema de controle de qualidade e segurança, considerando questões de praticidade, viabilidade econômica ou mesmo treinamento profissional de analistas.

Tabela 5. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de aeróbios mesófilos em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem.

X : Y	N	Spearman correlação	Coef. determinação	p	Gráfico fórmula
Swab de pele: Excisão de pele	59	0,884	0,781	< 0,0001	$y = 0,7795x + 1,23$
Lavagem superficial: excisão de tecido	56	0,768	0,590	< 0,0001	$y = 0,8x + 1,2148$
Swab de pele: Lavagem superficial	59	0,865	0,748	< 0,0001	$y = 0,8047x + 1,257$
Swab de pele: Excisão de tecido	55	0,784	0,615	< 0,0001	$y = 0,7172x + 1,8582$
Excisão de pele: Lavagem superficial	60	0,877	0,769	< 0,0001	$y = 0,9489x + 0,4116$
Excisão de pele: excisão de tecido	56	0,746	0,556	< 0,0001	$y = 0,7692x + 1,5222$

Tabela 6. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de Enterobacteriaceae em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem

X : Y	N	Spearman correlação	Coef. determinação	p	Gráfico fórmula
Swab de pele: Excisão de pele	54	0,772	0,596	< 0,0001	$y = 0,6444x + 1,5455$
Lavagem superficial: excisão de tecido	54	0,777	0,604	< 0,0001	$y = 0,8571x + 0,787$
Swab de pele: Lavagem superficial	54	0,734	0,538	< 0,0001	$y = 0,6371x + 1,6799$
Swab de pele: Excisão de tecido	51	0,710	0,504	< 0,0001	$y = 0,6875x + 1,7041$
Excisão de pele: Lavagem superficial	59	0,731	0,535	< 0,0001	$y = 0,8704x + 0,5804$
Excisão de pele: excisão de tecido	54	0,663	0,440	< 0,0001	$y = 0,8117x + 1,0611$

Tabela 7. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de coliformes totais em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem

X : Y	n	Spearman correlação	Coef. determinação	p	Gráfico fórmula
Swab de pele: Excisão de pele	56	0,748	0,560	< 0,0001	$y = 0,6706x + 0,9765$
Lavagem superficial: excisão de tecido	56	0,608	0,369	< 0,0001	$y = 0,5935x + 1,4932$
Swab de pele: Lavagem superficial	59	0,760	0,578	< 0,0001	$y = 0,7295x + 0,9317$
Swab de pele: Excisão de tecido	56	0,554	0,307	< 0,0001	$y = 0,5912x + 1,6621$
Excisão de pele: Lavagem superficial	57	0,742	0,551	< 0,0001	$y = 0,7795x + 0,6369$
Excisão de pele: excisão de tecido	54	0,476	0,226	0,0003	$y = 0,5057x + 1,7753$

Tabela 8. Parâmetros estatísticos de correlação (Spearman) entre contagens de *Escherichia coli* em carcaças de frango frescas, obtidas por diferentes técnicas de amostragem

X : Y	n	Spearman correlação	Coef. determinação	p	Gráfico fórmula
Swab de pele: Excisão de pele	43	0,646	0,418	< 0,0001	$y = 0,7031x + 0,9009$
Lavagem superficial: excisão de tecido	40	0,493	0,243	0,001	$y = 0,4444x + 1,5979$
Swab de pele: Lavagem superficial	46	0,622	0,386	< 0,0001	$y = 0,6802x + 0,992$
Swab de pele: Excisão de tecido	35	0,393	0,155	0,02	$y = 0,4632x + 1,693$
Excisão de pele: Lavagem superficial	54	0,724	0,525	< 0,0001	$y = 0,6089x + 0,9244$
Excisão de pele: excisão de tecido	38	0,192	0,037	0,247	$y = 0,1826x + 2,2235$

Os resultados obtidos permitem concluir que entre as metodologias de amostragem de carcaças de frangos, a excisão de tecidos apresentou maior capacidade de recuperação de micro-organismos indicadores de higiene. Entretanto, os dados de correlação entre os procedimentos avaliados permitem estabelecer uma equivalência entre técnicas destrutivas e não-destrutivas de amostragem, e entre resultados de contaminação superficial e total desses produtos. Essas informações são importantes fontes de referência para órgãos oficiais e indústrias de alimentos estabelecerem protocolos adequados de coleta de amostras, e permite a comparação de resultados obtidos por diferentes procedimentos de amostragem.

Referências

- Alvarez-Astorga, M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Moreno, B.; Garcia-Fernandez, M.C. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, v.62, p.45-50, 2002.
- Bolton, D.J. The EC decision of the 8th June 2001 (EC/471/2001): Excision versus swabbing. *Food control*, v.14, p.207-209, 2003.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12 de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 10 de janeiro de 2001.
- Capita, R.; Prieto, M.; Alson-Calleja, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, v.67, n.6, p.1303-1308, 2004.
- Cason, J.A., Berrang, M.E. Variation in numbers of bacteria on paired chicken carcass halves. *Poultry Science*, v.81, p.126-133, 2002.
- Cason, J.A.; Berrang, M.E.; Buhr, R.J.; Cox, N.A. Effect of prechill fecal contamination on number of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.67, n.9, p.1829-1833, 2004.
- Cox, N.A., Richardson, L.J., Cason, J.A., Buhr, R.J., Vizzier-Thaxton, V., Smith, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Romanenghi, C.P., Pereira, L.V.B., Doyle, M.P. Comparison of neck skin excision and whole carcasses rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.73, n.5, p.976-980, 2010.

- Daley, E.F., Pagotto, F.; Farber, J.M. The inhibitory properties of various sponges on *Listeria* spp. *Letters. in Applied Microbiology*. v.20, p.195-198, 1995
- Dorsa, W.J.; Cutter C.N.; Siragusa G.R. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Letters. in Applied Microbiology*. v.22, p.39-41, 1996.
- EC - European Community. Commission of the European Communities. EC. 2001. Commission decision of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks in the general hygiene carried out by the operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/ECC on health problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat. Document 2001/471/EC. Off. J. Eur. Communities 21.6.2001 L165:48-53. Available at: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2001/1_165/L66520010621en00480053.pdf.
- EC - European Community. Commission Regulation. EC no 1441/2007 de 5 de dezembro de 2007 que altera o regulamento (CE) no 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Official Journal of the European Union. L 322, p. 12 – 29. 7/12/2007.
- Gants, R.. Biocide free & sterile-precautions for sponge sampling. *Meat & Poultry*, v.43, p.44-50, 1997.
- Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., Zutter, L., Daube, G. Hygiene Indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, v.71, n.1, p.35-45, 2008.
- Gill, C. O., Jones, T. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*. v.63, n.2, p.167-173, 2000
- Gill, C.O.; Badoni M. Microbiological sampling of poultry carcasses by rinsing, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology*. v.22, p.101-107, 2005.
- Gill, C.O., Badoni, M., McGinnis, J.C. Microbiological Sampling of meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.64, n.3, p.325-334, 2001.
- Gill, C.O., Badoni, M., Moza, L.F., Barbut, S., Griffiths, M.W. Microbiological sampling of poultry carcasses portions by excision, rinsing, or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.68, n.12, p.2718-2720, 2005.
- Gill, C.O.; Moza, L.F.; Badoni, M.; Barbut, S. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a

- poultry packing plant *International Journal of Food Microbiology*, v.110, p.187-193, 2006.
- Grau, F. M. Microbiol ecology of meat and poultry. In: Pearson, A. M., Dutson, T. R. (Eds.), *Advances in Meat Research*, Vol. 2. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, p. 1-47. 1986.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Avery, S.M., Reid, C., Wilson, D., Howell, M., Johnston, A.M., Buncic, S. A comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine, and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.68, n.10, p.2155-2162, 2005.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Mead, G.C., Howell, M., Allen, V.M. An assessment of sampling methods and microbiological hygiene indicators for process verification in poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.69, n.1, p.145-153, 2006.
- Kotula, K.L.; Pandya, Y. Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *Journal of Food Protection*, v.58, n.12, p.1326-1329, 1995.
- Llabres, C.M.; Rose, B.E. Antibacterial properties of retail sponges. *Journal of Food Protection*, v.52, p.49-50, 1989.
- Mead, G.C., Hudson, W.R., Hinton, M.H. Use of marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. *British Poultry Science*, v.35, p.343-354, 1994.
- Miraglia, D., Ranucci, D., D'Ovidio, V., Branciarri, R., Severini, M. Comparison between carcass microbial load recovered by swabbing surfaces of different size and using the reference excision method. *Veterinary Research Communications*, v.29, p.339-341, 2005.
- Palumbo, S.A., Klein, P., Capra, J., Eblen, S., Miller, A.J., Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiology*, v.16, p.459-464, 1999.
- Pearce, R.A.; Bolton, D.J. Excision vs sponge swabbing – a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.896-900, 2005.
- Rodrigues, A.C.A; Pinto, P.S.A; Vanetti, M.C.D; Bevilacqua, P.D; Pinto, M.S; Nero, L.A. Analysis and monitoring of critical points in the poultry slaughter using microbiological indicators. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1948-1953, 2008.

- Russel, S. M., N. A. Cox, and J. S. Bailey. Sampling poultry carcasses and parts to determine bacterial levels. *The Journal of Applied Poultry Research*, v.6, p.234-237, 1997.
- Snijders, J.M.A.; Janssen, M.H.W.; Gerats, G.E.; Cortiaensen, G.P. A comparative study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p.229-236, 1984.
- USDA/FSIS - United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service. *Microbiology Laboratory Guidebook*, Capítulo 4.04, Outubro de 2008. <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>
- Werlein, H. -D. Comparison of destructively and rinsing gained samples to determine TVC of pig carcasses by bioluminescence. *Meat Science*, v.59, p.165-168, 2001.
- Zweifel, C., Baltzer, D., Stephan, R. Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determination by swab sampling in accordance with EU Decision 2001/471/EC. *Meat Science*, v.69, p.559-566, 2005.

ARTIGO 3. Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas de coleta de amostras em carcaças de frango para detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Resumo

Comparação entre metodologias destrutivas e não-destrutivas de coleta de amostras em carcaças de frango para detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

O monitoramento microbiológico de carcaças de frango é necessário para que haja um controle adequado da qualidade e segurança do produto final, evitando que microorganismos patogênicos e deteriorantes possam entrar na cadeia de produção e contaminar o alimento. Um dos cuidados preventivos para a garantia de confiabilidade das análises é a escolha correta da técnica a ser utilizada para a coleta das amostras. Neste trabalho foram comparados métodos destrutivos e não destrutivos de coleta de amostras em carcaça de frango para detecção de *E. coli* e *Salmonella* spp. 60 carcaças de frango resfriadas foram amostradas por 4 técnicas: 1) lavagem superficial e 2) swab de pele (não destrutivos); 3) excisão de tecido e 4) excisão de pele (destrutivos), em locais específicos da carcaça (perto e longe da região da cloaca). Foi pesquisada a contaminação por *E. coli* (Petrifilm™ EC) e *Salmonella* spp. (ISO 6579), e os resultados foram analisados para identificar possíveis diferenças estatísticas ($p < 0,05$). 48 carcaças de frango foram positivas para *E. coli* e 5 foram positivas para *Salmonella* spp. Não foram observadas diferenças significativas para presença de *E. coli* entre, lavagem superficial e excisão de tecido, lavagem superficial e excisão de pele, e excisão de pele e excisão de tecido ($p > 0,05$), enquanto que swab de pele obteve estatisticamente as mais baixas frequências de resultados positivos ($p > 0,05$), comparado com as outras técnicas testadas. Para presença de *Salmonella* spp, todas as diferenças encontradas entre as técnicas não foram significativas ($p > 0,05$), possivelmente pela baixa frequência de resultados positivos encontrados. Não foi observada diferença significativa entre os resultados positivos (*E. coli* ou *Salmonella* spp.), de amostras coletadas próximas ou distantes da região da cloaca ($p > 0,05$), independente da técnica de coleta de amostra utilizada. Os resultados obtidos mostraram que os procedimentos de amostragem apresentam equivalência, permitindo que indústrias de alimentos e agências reguladoras possam escolher qual técnica é a mais adequada para ser utilizada no controle de contaminações dos alimentos por *E. coli* e *Salmonella* spp, garantindo assim a segurança e a qualidade dos produtos.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, amostragem, frango

Abstract

Destructive and non-destructive chicken carcass sampling techniques for the detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.

Microbiological monitoring of chicken carcasses is necessary for adequate control of the quality and safety of final products, and helps prevent food contaminated with foodborne pathogens and spoilage microorganisms, such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*, from entering the food chain. Carcass sampling procedures are a key factor affecting the reliability of microbiological analyses. In this work, we compared destructive and non-destructive chicken carcass sampling procedures for *E. coli* and *Salmonella* spp. detection. 60 fresh chicken carcasses were sampled using 4 procedures: 1) rinsing and 2) skin swabbing (non-destructive), and 3) tissue excision and 4) skin excision (destructive); as well as sampling from specific sites (near and far from the cloacae region). *E. coli* (Petrifilm™ EC plates) and *Salmonella* spp. (ISO 6579) contamination was researched, and results analyzed to identify statistically significant differences ($p < 0.05$). 48 chicken carcasses were positive for *E. coli* and 5 were positive for *Salmonella* spp. For *E. coli* positive carcasses, non-significant differences were observed between rinsing and tissue excision, rinsing and skin excision, and skin excision and tissue excision ($p > 0.05$), while skin swabbing produced a statistically significant lower frequency of positive results ($p < 0.05$) than all other techniques. For *Salmonella* spp. positive carcasses, all differences between sampling techniques were non-significant ($p > 0.05$), possibly due to the low overall frequency of positive carcasses. No significant differences in the number of positive samples (*E. coli* or *Salmonella* spp.) were observed between samples collected near or far from the cloacae region ($p > 0.05$), regardless of the sampling technique. Our results demonstrate that these distinct sampling techniques are equivalent, allowing food industries and regulatory agencies to choose the most adequate procedure to control for *E. coli* and *Salmonella* spp. contamination in these products to assure food quality and safety.

Keywords: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, sampling, chicken

Introdução

Micro-organismos deteriorantes e patogênicos em carcaças de frango e seus derivados são preocupações constantes da indústria de alimentos e de órgãos de saúde de diversos países (Alvarez- Astorga et al., 2002). *Salmonella* spp. é o principal patógeno associado a esses produtos, e responsável por causar vários casos e surtos de toxinfecções alimentares associadas ao consumo de produtos avícolas contaminados (Vandeplass et al., 2010; Rasschaert et al., 2008; Chrystal et al., 2008; Smith et al., 2008; Wang et al., 2008). Por estar presente naturalmente no sistema gastrointestinal de aves, *Salmonella* spp. contamina facilmente as carcaças durante o abate, usualmente por alguma falha no processamento como ruptura de alças intestinais (Rasschaert et al., 2008; Reiter et al., 2007). Entretanto, a pesquisa convencional de *Salmonella* spp. em alimentos apresenta diversas limitações, principalmente em relação a sensibilidade e tempo de obtenção de resultados finais (Matias et al., 2010; Reiter et al., 2007), o que demanda o desenvolvimento de novos procedimentos alternativos (Matias et al., 2010; von Ruckert et al., 2008; Halatsi et al., 2006; Alcocer & Oliveira, 2003) ou mesmo a pesquisa de outro grupos que possam indicar a sua presença (Hauge et al., 2010; Ghafir et al. 2008; Alvarez-Astorga et al., 2002).

Micro-organismos de origem entérica são usualmente utilizados como indicadores da presença de *Salmonella* spp., além de sugerirem condições higiênicas inadequadas na produção (Ghafir et al., 2008; Alvarez- Astorga et al., 2002). Entre esses micro-organismos, *Escherichia coli* é considerado como uma boa opção para indicar a higiene de processos industriais e eventual presença de patógenos (Hauge et al., 2010; Ghafir et al., 2008). Entretanto, várias cepas de *E. coli* são sabidamente patogênicas, justificando ainda mais a sua pesquisa em alimentos, inclusive produtos avícolas (Tsola et al., 2008). Cepas virulentas de *Salmonella* e *E. coli* podem causar doenças agudas em humanos, com sintomas como diarreia, náusea, dor abdominal, febre e até mesmo levar pacientes com baixa imunidade a morte. Outras cepas podem ainda causar doenças crônicas como miopericardite, pericardite, algumas formas de artrites, e Síndrome de Guillian-Barre (Kotula & Pandya, 1995).

Independente do grupo ou patógeno a ser pesquisado num alimento, uma etapa fundamental para o sucesso e confiabilidade da análise a ser realizada é o procedimento utilizado para coleta de amostra. O melhor procedimento a ser adotado é aquele que permite a recuperação mais adequada e mais confiável dos micro-organismos alvo

presentes na amostra. Vários procedimentos podem ser aplicados em carcaças animais para obtenção de amostras, sendo usualmente divididas entre métodos destrutivos e não destrutivos (Capita et al., 2004; Snijders et al., 1984). Cada método de amostragem possui vantagens e desvantagens, que devem ser analisadas em relação ao tempo gasto para coleta, facilidade de aplicação, disponibilidade de pessoal e material, e obtenção de dados que tenham melhor reprodutibilidade (Palumbo et al., 1999). Considerando essas características, pode-se optar pela técnica que seja mais adequada ao objetivo do monitoramento microbiológico (Gill & Badoni, 2005; Gill & Jones, 2000).

O objetivo desse trabalho foi comparar metodologias destrutivas e não-destrutivas de amostragem de carcaças de frango para detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., verificando suas limitações e possíveis equivalências.

Material e Métodos

Coleta de carcaças de frango

Um total de 60 carcaças de frango resfriadas, “in natura”, foi adquirido em estabelecimentos comerciais no município de Viçosa e região, Minas Gerais, Brasil. Cada carcaça foi coletada em sua embalagem original, acondicionada em recipiente isotérmico e mantida sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais.

Procedimentos de amostragem das carcaças de frango e diluições

Em condições assépticas, cada carcaça foi dividida em duas metades iguais a partir de secção ao longo da coluna vertebral com faca estéril (Figura 1). Uma metade foi utilizada para obtenção de amostra por lavagem superficial (procedimento não-destrutivo), conforme USDA/FSIS (2008), com alterações. A metade da carcaça foi acondicionada em uma bag estéril, pesada e adicionada da mesma quantidade (em volume) de água peptonada 0,1% (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), sendo o conjunto massageado manualmente por 5 minutos. O homogenato obtido foi acondicionado em um frasco estéril, sendo considerado como concentração final de 1mL = 1g.

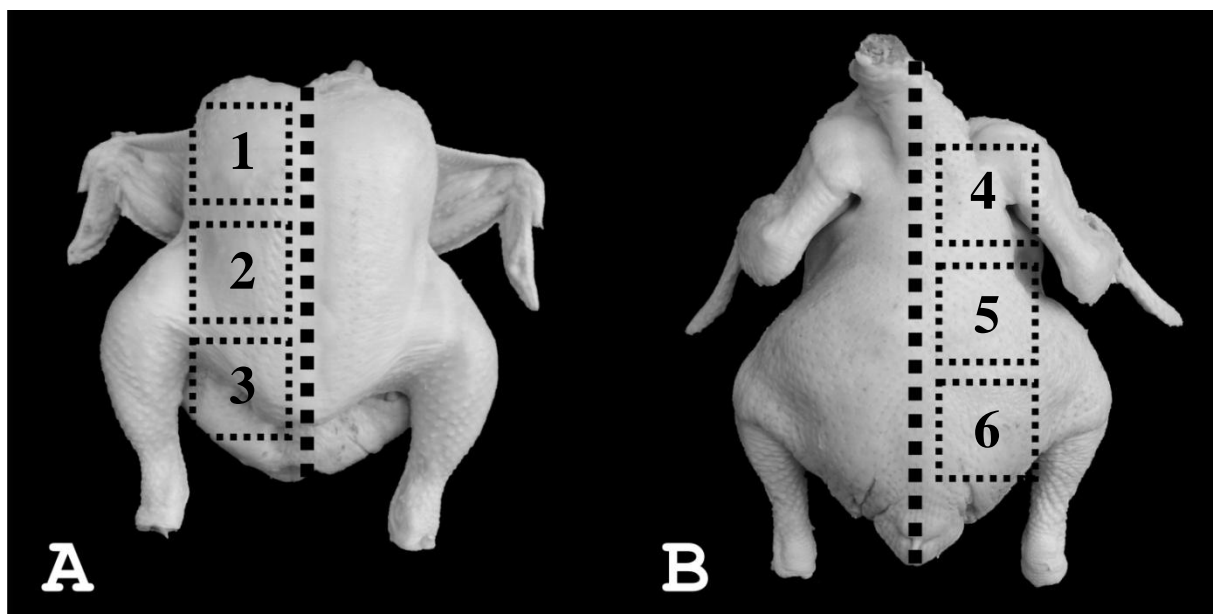


Figura 1. Visão Frontal (A) e Dorsal (B) de uma carcaça típica de frango, demonstrando a divisão da carcaça em duas metades (linha pontilhada marcando o meio da carcaça).

Em uma das metades da carcaça foi utilizado o método lavagem superficial. A outra metade foi dividida em 6 áreas (quadrados pontilhados) e foram amostrados por excisão de tecido, excisão de pele e esfregaço superficial de pele. Os quadrados enumerados de 1, 2, 4 e 5 foram considerados distantes da cloaca e os quadrados 3 e 6 foram considerados próximos a cloaca.

A outra metade foi submetida à amostragem por dois procedimentos destrutivos (excisão de tecidos e excisão de pele) e um não-destrutivo (swab de superfície), conforme Gill et al. (2006). As porções peitoral e dorsal da meia-carcaça foram divididas em seis áreas delimitadas de 25 cm^2 ($5 \times 5 \text{ cm}$) com moldes estéreis, que foram utilizados como referência para obtenção de amostras pelos procedimentos citados (Figura 1). Para obtenção das amostras por cada procedimento, duas áreas eram aleatoriamente selecionadas considerando ambas as porções da meia-carcaça, totalizando 50 cm^2 ou g, além de proximidade ou não à região cloacal (Figura 1).

A amostragem por swab (não-destrutiva) ocorreu por esfregaço de esponjas estéreis previamente umedecidas (5 mL de água peptonada 0.1%, Oxoid) nas áreas selecionadas, e acondicionadas em bags estéreis, adicionadas de 45mL de água peptona 0.1% (Oxoid) e homogeneizadas em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^2$.

A amostragem por excisão de tecido (destrutiva) ocorreu por retirada de fragmentos de pele e tecido muscular das áreas selecionadas com bisturi e pinças estéreis, e acondicionados em bags estéreis até atingir o peso de 25g. Em seguida, 225 mL de água peptonada 0.1% (Oxoid) foi adicionado e homogeneizado em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de 1 mL = 0.1 g (diluição 1:10).

A amostragem por excisão de pele (destrutiva) ocorreu por retirada da pele com bisturi e pinça estéreis das áreas selecionadas, acondicionadas em bags estéreis com 50 mL de água peptonada 0.1% (Oxoid), e submetidas à homogeneização em “Stomacher (Stomacher 400 Circulator – Seward)”. O homogenato obtido foi considerado como possuindo concentração final de 1 mL = 1 cm².

Todos os homogenatos obtidos foram submetidos à diluição seriada em escala decimal até 1:100, utilizando como diluente água peptonada 0.1% (Oxoid).

Pesquisa de Escherichia coli

Para cada método de amostragem de carcaça e frango analisada, a diluição 1:100 foi semeada em placas Petrifilm™ Escherichia coli (3M Microbiology) para pesquisa de *E. coli*, com incubação a 35 °C por 24-48h. A presença de pelo menos uma colônia azul com formação de gás foi considerada como indicativo de resultado positivo para *E. coli*, em concentração igual ou superior a 100 ufc/g ou cm². A concentração escolhida para que a amostra fosse considerada positiva para *E. coli* levou em consideração os parâmetros microbiológicos internacionais exigidos para este micro-organismo, que encontra-se entre 2.0 e 4.0 log UFC/g ou cm² dependendo do país (USA, 2003; Álvarez-Astorga et al., 2002).

Pesquisa de Salmonella spp.

As amostras foram avaliadas quanto à presença de *Salmonella* spp. de acordo com o protocolo ISO 6579, com algumas modificações (ISO, 2002). As alíquotas de 25 g das amostras foram adicionadas a 225 mL de água peptonada 1% (Oxoid), com incubação a 37 °C por 18h (etapa de pré-enriquecimento). Em seguida, 1 mL da cultura obtida foi inoculado em 10 mL de caldo Selenito Cistina (Oxoid) (incubação a 37 °C por 24h) e 0.1 mL em 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid) (42.5 °C por 24h, em Banho-Maria) (enriquecimento seletivo). Após incubação, as culturas foram

estriadas em ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Oxoid) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24h (plaqueamento seletivo). Colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella* spp. foram repicadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (Oxoid) e ágar Lisina Ferro (Oxoid) (incubação a 35 °C por 24h), para verificação de reações típicas desse micro-organismo. Culturas que apresentaram reações típicas em pelo menos um desses meios de cultura foram submetidas à confirmação sorológica com antisoros polivalentes somático e flagelar (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), e confirmação molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (Alvarez et al., 2004; Galán et al., 1992).

As culturas suspeitas foram purificadas após 3 passagens sucessivas em ágar tripticase de soja (Oxoid), incubadas a 35 °C por 24h, e semeadas em água peptonada 0.1% (Oxoid), com incubação a 35 °C por 24h. As culturas obtidas foram submetidas à extração de DNA com o *Wizard® Genomic Purification Kit* (Promega, Madison, WI, EUA). Para confirmação do gênero *Salmonella* spp. foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos: *invA* (Galán et al., 1992) e *ompC* (Alvarez et al., 2004). O par *invA* (forward: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA; reverse: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C), com 284 pb, foi projetado para detectar e amplificar um fragmento de DNA do gene *invA*, responsável pela invasão do micro-organismo nos enterócitos, e foi pesquisado com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 7 min (Galán et al., 1992). O par *ompC* (forward: ATC GCT GAC TTA TGC AAT CG; reverse: CGG GTT GCG TTA TAG GTC TG; 204 pares de bases), com 204 pb, amplifica um fragmento do gene *ompC* de *Salmonella* spp., responsável por oferecer resistência a alguns antimicrobianos, e foi pesquisado com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, com extensão final a 72 °C por 5 min (Alvarez et al., 2004). As reações foram realizadas com o mix comercial *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL de cada primer e 2 µL do DNA extraído de cada cultura. O controle negativo foi feito substituindo o DNA por 2 µL de água estéril livre de nuclease. O volume final de reação foi 25 µL para os dois protocolos de amplificação. Os produtos de amplificação foram corados com GelRed™ Nucleid Acid

Gel Staim (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % e observados em transiluminador. .

Tanto para pesquisa convencional de *Salmonella* spp quanto para realização da PCR, foram utilizados como controle positivo, cultura ATCC 13076.

Considerando todas as etapas de confirmação, os resultados finais foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g ou cm² de cada amostra.

Análise dos dados

Os dados de detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli* foram comparados pelo teste de McNemar para verificação da coincidência entre os resultados considerando diferentes procedimentos de amostragem ($P < 0.05$). Ainda, as frequências de amostras positivas foram comparadas considerando diferentes regiões de coleta de amostras (próximos ou distantes da cloaca) pelos diferentes procedimentos de amostragem, para verificação de diferenças significativas pelo chi-quadrado ($P < 0.05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e XLSTAT 2009.1.02 (Addinsoft USA, New York, NY, USA).

Resultados e Discussão

As frequências de resultados positivos para presença de *E. coli* (>100 UFC/cm² ou g) e *Salmonella* spp. são representados na Tabela 1. Considerando apenas os resultados positivos por uma ou mais técnica de coleta de amostra, 48 apresentaram *E. coli* e 5 *Salmonella* spp. Em relação a cada método de amostragem, lavagem superficial de carcaça e excisão de tecido foram as técnicas que obtiveram a maior frequência de resultados positivos para *E. coli*, enquanto swab de carcaça foi a que obteve a frequência mais baixa. Para *Salmonella*, apenas por swab de carcaça não foi possível recuperar o micro-organismo de nenhuma das amostras, em todas as outras três técnicas, *Salmonella* spp foi recuperada de duas amostras.

Em estudo similar, Gill & Badoni (2005) identificaram *E. coli* em 100% das amostras de carcaças de frango utilizando excisão de pele de diferentes áreas (1, 10 e 100 cm²). Em trabalho realizado com suínos, Lindblad (2007) constatou que o método swab de carcaça com gaze permite uma maior frequência de resultados positivos para *E. coli* quando comparado com excisão de tecido, sendo o material utilizado para a

realização do swab (mais abrasivo) uma provável justificativa para este resultado. Gill & Jones (2000) compararam excisão de tecido com três diferentes materiais para swab e identificaram frequência semelhante de resultados positivos para *E. coli* entre os métodos testados, porém todos com frequência inferior a 50%, que é menor que a frequência encontrada no presente estudo. Gill & Jones (2000) também analisaram a relação entre o tamanho da área utilizada para swab e a frequência de resultados positivos para *E. coli*, concluindo que, com o aumento da área há um aumento na frequência de detecção desse micro-organismo. Outro trabalho que comparou excisão de tecido, lavagem superficial de carcaça e swab de carcaça, observou maior frequência de detecção de *E. coli* utilizando lavagem superficial de carcaça, sendo este método mais apropriado para micro-organismos usualmente presentes em baixas concentrações, como é o caso da *E. coli* (Gill et al., 2005).

Tabela 1. Frequências de resultados positivos para *E. coli* (contagem igual ou superior a 100 ufc/cm² ou g) e *Salmonella*, por técnica de amostragem e independente de técnica de amostragem.

Técnica de amostragem	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Lavagem superficial	40	2
Excisão de tecido	40	2
Excisão de pele	34	2
Swab de pele	24	0
Geral	48	5

As comparações entre os resultados positivos e negativos obtidos por cada método de amostragem estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3. Para *E. coli* (Tabela 2) foi encontrada coincidência de resultados significante entre lavagem superficial de carcaça e excisão de tecido, excisão de pele e lavagem superficial de carcaça, e entre excisão de pele e excisão de tecido. Dentre esses resultados, a coincidência encontrada entre lavagem superficial de carcaça e excisão de tecido é uma importante informação, uma vez que possuem a mesma unidade de amostragem e que lavagem superficial de carcaça é um método não destrutivo, sendo uma opção para indústrias de alimentos, prevenindo

a desfiguração da carcaça durante o monitoramento microbiológico da linha de produção. Esse resultado também é importante, pois diversos trabalhos apresentam a excisão de tecido como a melhor opção para contagem de *E. coli* (Capita et al., 2004; Gill et al., 2001; Gill & Jones, 2000), sem levar em consideração os resultados positivos de detecção obtidos por cada uma das técnicas de coleta de amostras testadas. Dessa forma, as indústrias ou pesquisadores podem escolher qual método de amostragem é o mais apropriado, considerando os objetivos pretendidos com a análise dos dados de contaminação do produto.

Cox et al. (2010) compararam resultados positivos para *E. coli* em carcaças de frango amostrados por lavagem superficial e excisão de tecidos e não observaram diferenças significativas entre as metodologias. Por comparação pareada, swab de carcaça foi o procedimento que apresentou menor número de resultados positivos para *E. coli*, sendo estatisticamente inferior aos demais. Considerando esses resultados, a comparação entre swab de carcaça e excisão de pele é apropriada uma vez que possuem a mesma unidade amostral, e mesmo tendo a desvantagem de ser uma técnica destrutiva, excisão de pele foi a que obteve o melhor resultado na detecção de *E. coli*.

Em relação a *Salmonella* spp. (Tabela 3), foi observada coincidência significativa entre todos os métodos analisados, o que pode ter sido ocasionado pela baixa frequência de resultados positivos encontrados no estudo. Em trabalho similar, Cox et al. (2010) compararam a frequência de identificação de *Salmonella* spp. em carcaça de frango por lavagem superficial e excisão de tecido, e não observaram diferenças significativas entre as técnicas.

Tabela 2. Teste McNemar para presença/ausência de *E. coli* (quantidade mínima de 100 UFC por cm² ou g)

Comparação pareada de técnicas de amostragem.	Coincidência		Divergência		Q*	P
	Positivo	Negativo	Positivo : Negativo	Negativo : Positivo		
Swab de pele: Excisão de pele	20	22	4	14	5,56	0,031
Lavagem superficial: Excisão de tecido	32	12	8	8	0,00	0,804
Swab de pele: Lavagem superficial	21	17	3	19	11,64	0,001
Swab de pele: Excisão de tecido	21	17	3	19	11,64	0,001
Excisão de pele: Lavagem superficial	29	15	5	11	2,25	0,21
Excisão de pele: Excisão de tecido	29	15	5	11	2,25	0,21

* Teste McNemar. Valores de P menores que 0.05 indicam diferença significante entre o par de técnicas de amostragem comparado.

Tabela 3. Teste McNemar para presença/ausência de *Salmonella* (quantidade mínima de 1 *Salmonella* por 25 cm² ou g.)

Comparação pareada de técnicas de amostragem	Coincidência		Divergência		Q*	P
	Positivo	Negativo	Positivo : Negativo	Negativo : Positivo		
Swab de pele: Excisão de pele	0	58	0	2	2.000	0.500
Lavagem superficial: Excisão de tecido	0	56	2	2	0.000	0.625
Swab de pele: Lavagem superficial	0	58	0	2	2.000	0.500
Swab de pele: Excisão de tecido	0	58	0	2	2.000	0.500
Excisão de pele: Lavagem superficial	0	56	2	2	0.000	0.625
Excisão de pele: Excisão de tecido	1	57	1	1	0.000	0.500

* Teste McNemar. Valores de P menores que 0.05 indicam diferença significante entre o par de técnicas de amostragem comparado.

Salmonella spp é um micro-organismo que normalmente encontra-se em baixas concentrações em carcaças de frango, o que limita a utilização de procedimentos de amostragem com baixa sensibilidade, que acabam subestimando a presença desse micro-organismo (Cox et al., 2010). Essa limitação foi avaliada por King et al. (2008), que testaram diferentes volumes de homogenato oriundos da lavagem superficial de carcaças de frango para pesquisa de *Salmonella* spp., e obtiveram maiores frequências de resultados positivos quando consideraram as análises com maiores volumes. Foram analisados volumes de homogenato iguais a 30, 50 e 400ml, obtendo porcentagens de detecção do micro-organismo equivalentes a 20, 38 e 48%, respectivamente.

Considerando que os micro-organismos analisados neste estudo são de origem entérica, outro fator considerado importante é a localização do ponto de amostragem da carcaça, considerando-se regiões potencialmente mais contaminadas aquelas próxima a região cloacal em aves (Cason & Berrang, 2002; Palumbo et al., 1999; Kotula & Pandya, 1995). Os resultados obtidos por cada procedimento de amostragem (exceto a lavagem superficial) foram agrupados e comparados estatisticamente e não foram observadas diferenças significativas entre amostragens próximas ou distantes da cloaca (Tabela 4). Em estudo anterior em suínos, Palumbo et al. (1999) observaram que a região em que se realiza a coleta da amostra tem influência significativa no resultado final, sendo o pernil uma região mais contaminada que as demais (barriga e mandíbula). O mesmo ocorre para carne vermelha, em que alguns pontos da carcaça como peito e pescoço e garupa são mais susceptíveis a contaminação microbiana devido às etapas de esfola e evisceração no abate (Grau, 1986). No abate de aves, o processo de evisceração tende a contaminar a carcaça de maneira semelhante ao descrito para carne vermelha, porém as diversas etapas de lavagem que ocorrem posteriormente determinam uma distribuição uniforme da contaminação microbiana por toda a carcaça (Gill & Badoni, 2005; Mead et al., 1994).

Tabela 4. Comparação entre locais de amostragem na carcaça, considerando métodos de amostragem, considerando presença de *E. coli* (10 ou 100 UFC/cm² ou g) e *Salmonella* spp (1 *Salmonella*/25 cm² ou g)

Técnicas de amostragem	Local de amostragem	N	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Excisão de tecido	Próximo a cloaca	37	26	1
	Distante da cloaca	23	14	1
Excisão de pele	Próximo a cloaca	36	20	2
	Distante da cloaca	24	14	0
Swab de pele	Próximo a cloaca	36	14	0
	Distante da cloaca	24	10	0
	χ^2		9,375	4,268
	P		0,095	0,512

De forma geral não foram observadas muitas diferenças entre as técnicas analisadas neste estudo com exceção da semelhança significativa encontrada entre a detecção de *E. coli* por lavagem superficial de carcaça e excisão de tecido, sendo este resultado importante uma vez que lavagem superficial possui a vantagem de não danificar a carcaça amostrada. Estudos como este, cujo foco é a detecção dos microorganismos, são importantes por oferecerem opções para indústrias de alimentos e órgãos de fiscalização escolham os procedimentos mais adequados para a coleta de amostras e monitoramento microbiológico da linha de produção.

Referências

Alcocer, I.; Oliveira, T.C.R.M. Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.401-408, 2003.

- Alvarez-Astorga, M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Moreno, B.; Garcia-Fernandez, M.C. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, v.62, p.45-50, 2002.
- Alvarez, J.; Sota, M.; Vivanco, A.; Perales, I.; Cisterna, R.; Rementeria, A.; and Garaizar, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.1734-1738, 2004.
- Capita, R.; Prieto, M.; Alson-Calleja, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, v.67, n.6, p.1303-1308, 2004.
- Cason, J.A., Berrang, M.E. Variation in numbers of bacteria on paired chicken carcass halves. *Poultry Science*, v.81, p.126-133, 2002.
- Chrystal, N.D.; Hargraves, S.J.; Boa, A.C.; Ironside, C.J. Counts of *Campylobacter* spp and Prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, v.71, n.12, p.2526-2532, 2008.
- Cox, N.A., Richardson, L.J., Cason, J.A., Buhr, R.J., Vizzier-Thaxton, V., Smith, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Romanenghi, C.P., Pereira, L.V.B., Doyle, M.P. Comparison of neck skin excision and whole carcasses rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, v.73, n.5, p.976-980, 2010.
- Galán, J.E.; Ginocchio, C.; and Costeas, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology*, v.174, p.4338-4349, 1992.
- Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Daube, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, v.71, n.1, p.35-45, 2008.
- Gill, C.O.; Badoni, M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rising, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology*, v.27, p.101-107, 2005.
- Gill, C. O., Jones, T. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*. v.63, n. 2, p.167-173, 2000.
- Gill, C.O.; Moza, L.F.; Badoni, M.; Barbut, S. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant *International Journal of Food Microbiology*, v.110, p.187-193, 2006.

- Gill, C.O., Badoni, M., Mcginnis, J.C. Microbiological sampling meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, v.64, n.3, p.325-334, 2001.
- Gill, C.O.; Badoni, M.; Moza, L.F.; Barbut, S.; Griffiths, M.W. Microbiological Sampling of Poultry Carcass Portions by Excision, Rinsing, or Swabbing. *Journal of Food Protection*, v.68, n.12, p.2718-2720, 2005.
- Grau, F. M. Microbiol ecology of meat and poultry. In: Pearson, A. M., Dutson, T. R. (Eds.), *Advances in Meat Research*, Vol. 2. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, USA, 1986, p. 1-47. 1986
- Halatsi, K.; Oikonomou, I.; Lambiri, M.; Mandilara, G.; Vatopoulos, A.; Kyriacou, A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdi A*. *FEMS Microbiology Letters*, v.259, p.201-207, 2006.
- Hauge, S.J.; Nesbakken, T.; Skjerve, E.; Dommarsnes, K.; Ostensvik, O. Evaluation of the SimPlate method for enumeration of *Escherichia coli* in swab samples from beef and lamb carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v.142, p.229-233, 2010.
- ISO - International Organization for Standardization. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed, 2002.
- King, S.; Galca, F.; Hornitzky, M.; Adams, M.C. A comparative evaluation of the sensitivity of Salmonella detection on processed chicken carcasses using Australian and US methodologics. *Letters in Applied Microbiology*, v.46, p.205-209, 2008
- Kotula, K.L., and Pandya, Y. Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *Journal of Food Protection*, v.58, n.12, p.1326-1329, 1995.
- Lindbland, M. Microbiological sampling of swine carcasses: A comparison of data obtained by swabbing with medical gauze and data collected routinely by excision at Swedish abattoirs. *International Journal of Food Microbiology*, v.118, p.180-185, 2007.
- Matias, B.G.; Pinto, P.S.A.; Cossi, M.V.C.; Silva Jr., A.; Vanetti, M.C.D.; Nero, L.A. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry Science*, v.89, p.1524-1529, 2010.

- Mead, G.C., Hudson, W.R., Hinton, M.H. Use of marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. *Brazilian Poultry Science*, v.35, p.343-354, 1994.
- Palumbo, S.A., Klein, P., Capra, J., Eblen, S., Miller, A.J., Comparison of excision and swabbing sampling methods to determine the microbiological quality of swine carcass surfaces. *Food Microbiology*, v.16, p.459-464, 1999.
- Rasschaert, G.; Houf, K.; De Zutter, L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.333-341, 2008.
- Reiter, M.G.R.; Fiorese, M.L.; Moretto, G.; López, M.C.; Jordano, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, v.70, n.7, p.172-172, 2007.
- Smith, K.E.; Medus, C.; Meyer, S.D.; Boxrud, D.J.; Leano, F.; Hedberg, C.W.; Elfering, K.; Braymen, C.; Bender, J.B.; Danila, R.N. Outbreaks of Salmonellosis in Minnesota (1998 through 2006) associated with frozen, microwaveable, breaded, stuffed chicken products. *Journal of Food Protection*, v.71, n.10, p.2153-2160, 2008.
- Snijders, J.M.A.; Janssen, M.H.W.; Gerats, G.E.; Cortiaensen, G.P. A comparative study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, p.229-236, 1984.
- Tsola E.; Drosinos E.H.; Zoiopoulos, P. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, v.19, p.423-431, 2008.
- USA - USDA, 2003. Code of Federal Regulations, Title 9 (Animals and Animal Products), Chapter III (Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture), Part 381 (Poultry Products Inspection Regulations). Revised at 01 January 2003, available at http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/9cfr381_03.html
- USDA/FSIS - United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service. *Microbiology Laboratory Guidebook*, Capítulo 4.04, Outubro de 2008. http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp.
- Vandeplas, S.; Dauphin, R.D.; Beckers, Y.; Thonart, P.; Théwis, A. *Salmonella* in chicken: Current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal of Food Protection*, v.73, n.4, p.774-785, 2010.

- Von Ruckert, D.A.S.; Pinto, P.S.A.; Vanetti, M.C.D.; Moraes, M.P.; Silva Jr, A.; Nero, L.A. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* spp. monitoring in chicken. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v.16, p.185-195, 2008.
- Wang, L.; Shi, L.; Alam, M.J.; Geng, Y.; Li, L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*, v.41, p.69-74, 2008.

CONCLUSÕES

Foi possível concluir com este trabalho que não houve diferença significativa em relação a qualidade microbiológica das carcaças de frango com inspeção e sem inspeção, sendo necessário, independente deste resultado, ressaltar a importância do serviço de inspeção, uma vez que é responsável não somente pela qualidade e segurança microbiológica mais também questões de sanidade animal, contaminações químicas e outros aspectos que podem representar riscos aos consumidores.

Conclui-se também que em relação às quatro técnicas de coleta de amostras, excisão de tecido foi o protocolo que obteve os melhores resultados para enumeração de micro-organismos, além de ter sido possível estabelecer correlações entre as técnicas.

Ainda sobre as 4 técnicas de coleta de amostras, não houveram diferenças significativas em relação a capacidade de detecção de cada protocolo, exceto a semelhança encontrada entre os resultados da lavagem superficial e excisão de tecido, o que é muito interessante uma vez que a lavagem superficial é uma técnica não destrutiva e representa uma importante opção no momento de se escolher o método para coleta de amostra.

De forma geral, os resultados obtidos em relação às diferentes técnicas de coleta evidenciaram opções que podem ser levadas em consideração por indústrias de alimentos, agências regulatórias e pesquisadores, tendo em vista o objetivo que cada um deseja alcançar com seu trabalho.

RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 1. Resultados detalhados das contagens de aeróbios mesófilos pelas quatro técnicas de coleta de amostras.

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
1	Não	216000	237000	70000	97000
2	Não	206000	109000	73000	75000
3	Não	245000	177000	61000	140000
4	Não	174000	102000	340000	25000
5	Não	299000	44000	260000	35000
6	Não	290000	240000	430000	226000
7	Não	171000	54000	87000	330000
8	Não	41000	75000	110000	40000
9	Não	76000	39000	94000	80000
10	Não	124000	182000	130000	46000
11	Não	84000	64000	210000	152000
12	Não	3980000	4130000	4750000	2790000
13	Não	236000	272000	2320000	224000
14	Não	1180000	1160000	230000	980000
15	Não	3670000	2110000	15300000	1610000
16	Não	98000	60000	270000	65000
17	Não	120000	65000	220000	71000
18	Não	4320000	3620000	7100000	2650000
19	Não	4820000	3740000	5200000	1300000
20	Não	470000	370000	140000	260000
21	Não	510000	180000	1000000	210000
22	Não	2200000	1620000	7300000	1870000
23	Não	1050000	800000	2300000	970000
24	Não	102000	51000	320000	43000
25	Não	270000	210000	240000	125000
26	Não	138000	197000	280000	210000
27	Não	139000	108000	580000	790000
28	Não	510000	620000	410000	157000
29	Não	119000	158000	200000	400000
30	Não	710000	460000	1070000	270000
31	Sim	151000	93000	610000	7000
32	Sim	66000	32000	50000	27000
33	Sim	296000	190000	390000	500000
34	Sim	1210000	1120000	1440000	1720000
35	Sim	3240000	2200000	12000000	4010000
36	Sim	1670000	1350000	2890000	3250000
37	Sim	1800000	1380000	1800000	2870000
38	Sim	12000	21000	80000	33000
39	Sim	27000	4000	100000	7000
40	Sim	19000	1000	10000	8000
41	Sim	3000	1000	<100	10000

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
42	Sim	17000	3000	120000	21000
43	Sim	114000	370000	250000	135000
44	Sim	169000	27000	100000	122000
45	Sim	910000	88000	30000	320000
46	Sim	280000	134000	260000	460000
47	Sim	5000	2000	<100	8000
48	Sim	2930000	1860000	2180000	1650000
49	Sim	4070000	2340000	3420000	3450000
50	Sim	4000	3000	10000	5000
51	Sim	121000	9000	50000	21000
52	Sim	98000	12000	440000	28000
53	Sim	1390000	1010000	560000	890000
54	Sim	1930000	1500000	7100000	470000
55	Sim	2790000	2370000	6700000	2790000
56	Sim	1000	2000	10000	2000
57	Sim	4000	2000	<100	6000
58	Sim	2000	2000	<100	5000
59	Sim	3000	<100	10000	5000
60	Sim	3780000	8000	300000	154000

Tabela 2. Resultados detalhados das contagens de Enterobactérias pelas quatro técnicas de coleta de amostras.

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
1	Não	9000	2000	<100	2000
2	Não	750	1420	2300	880
3	Não	3600	350	14900	5200
4	Não	25400	2950	25700	1970
5	Não	2110	2280	14500	3350
6	Não	3400	3000	7000	4000
7	Não	11100	1700	7000	6100
8	Não	3400	9500	7000	15300
9	Não	6900	1800	4300	7000
10	Não	9100	4400	27000	7100
11	Não	3300	700	8300	1400
12	Não	>300	308000	>300	>300
13	Não	8300	1400	20000	2100
14	Não	142000	102000	35000	146000
15	Não	259000	28000	275000	31000
16	Não	14500	6600	5500	12000
17	Não	130000	98000	370000	102000
18	Não	21000	52000	49000	31000
19	Não	31000	3000	30000	2100
20	Não	9000	800	2000	1200
21	Não	3000	1200	15000	1600
22	Não	10800	9700	21000	11500
23	Não	7700	7100	33000	8200
24	Não	3500	2300	11000	4100
25	Não	2200	18000	14000	3000
26	Não	5500	5500	11000	7100
27	Não	2600	1100	15000	6900
28	Não	6800	1400	6000	3300
29	Não	3100	1600	3000	3100
30	Não	6600	1200	19000	3700
31	Sim	6000	8000	4000	1000
32	Sim	6100	1000	5000	2000
33	Sim	1200	1000	4000	2800
34	Sim	12800	218000	65000	13900
35	Sim	128000	136000	1200000	204000
36	Sim	107000	99000	100000	123000
37	Sim	189000	108000	198000	297000
38	Sim	101000	10000	10000	17100
39	Sim	5300	500	2000	7700
40	Sim	5000	100	3000	1700

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
41	Sim	1100	1200	100	10700
42	Sim	300	100	2000	8000
43	Sim	34000	64000	37000	19600
44	Sim	43000	6500	40000	8800
45	Sim	46000	17000	3000	55000
46	Sim	46000	22000	25000	12100
47	Sim	1000	<100	1000	500
48	Sim	147000	146000	410000	112000
49	Sim	151000	205000	1160000	290000
50	Sim	200	<100	1000	100
51	Sim	11000	1000	9000	1500
52	Sim	11700	500	64000	3400
53	Sim	14600	10900	90000	10600
54	Sim	70000	82000	390000	129000
55	Sim	335000	414000	1950000	198000
56	Sim	100	<100	1000	400
57	Sim	900	300	<100	500
58	Sim	200	<100	<100	300
59	Sim	100	<100	<100	400
60	Sim	700	2000	<100	12700

Tabela 3. Resultados detalhados das contagens de Coliformes totais pelas quatro técnicas de coleta de amostras.

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
1	Não	1100	190	900	<100
2	Não	450	280	700	490
3	Não	310	110	800	130
4	Não	5500	560	6000	510
5	Não	440	100	900	100
6	Não	370	160	600	780
7	Não	510	400	4400	1250
8	Não	320	310	700	750
9	Não	660	470	1200	670
10	Não	390	270	3900	270
11	Não	130	100	300	140
12	Não	390	380	1200	810
13	Não	740	180	4000	280
14	Não	3000	2000	2000	1000
15	Não	14000	3000	5000	3000
16	Não	3000	630	1100	530
17	Não	230	180	800	180
18	Não	1200	900	600	300
19	Não	400	700	6000	700
20	Não	90	70	100	50
21	Não	100	30	900	80
22	Não	190	200	800	170
23	Não	60	40	500	70
24	Não	1700	1600	13000	800
25	Não	2300	2300	1300	900
26	Não	1600	1400	5000	1900
27	Não	320	150	4800	400
28	Não	360	140	300	40
29	Não	210	180	500	130
30	Não	430	90	2800	270
31	Sim	130	40	400	40
32	Sim	130	130	900	200
33	Sim	70	10	300	50
34	Sim	2500	10800	16000	1900
35	Sim	60	100	1700	130
36	Sim	330	40	2600	1440
37	Sim	200	120	1500	160
38	Sim	1110	1630	5500	1690
39	Sim	430	180	1100	1560
40	Sim	3400	170	1900	1260
41	Sim	410	130	500	1100

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
42	Sim	440	80	2100	510
43	Sim	70	170	400	280
44	Sim	210	140	600	290
45	Sim	740	480	100	2100
46	Sim	230	220	400	2200
47	Sim	490	110	200	410
48	Sim	30	100	1900	10
49	Sim	1600	1500	9000	400
50	Sim	110	10	<100	70
51	Sim	50	<100	<100	100
52	Sim	150	30	<100	<100
53	Sim	10800	4900	18000	7200
54	Sim	10300	10700	8000	Inc
55	Sim	7500	6000	29000	8500
56	Sim	140	100	300	160
57	Sim	1410	110	800	260
58	Sim	40	50	<100	50
59	Sim	270	20	100	80
60	Sim	140	350	100	520

Tabela 4. Resultados detalhados das contagens de *Escherichia coli* pelas quatro técnicas de coleta de amostras.

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
1	Não	700	40	200	<100
2	Não	350	100	300	350
3	Não	180	70	<100	80
4	Não	2500	310	2300	270
5	Não	130	40	600	30
6	Não	210	20	100	450
7	Não	290	270	1800	890
8	Não	130	70	100	570
9	Não	530	200	700	410
10	Não	240	140	<100	100
11	Não	80	40	<100	60
12	Não	50	90	500	160
13	Não	340	90	2800	180
14	Não	1000	<100	<100	<100
15	Não	2000	<100	<100	<100
16	Não	2200	530	200	410
17	Não	100	100	300	70
18	Não	100	<100	100	100
19	Não	<100	<100	<100	200
20	Não	30	10	<100	20
21	Não	90	<100	900	10
22	Não	80	110	500	70
23	Não	20	10	<100	60
24	Não	500	<100	<100	300
25	Não	700	800	400	500
26	Não	300	100	<100	500
27	Não	20	10	200	180
28	Não	140	<100	<100	10
29	Não	70	40	<100	60
30	Não	110	<100	300	120
31	Sim	100	200	100	10
32	Sim	400	70	800	160
33	Sim	70	10	<100	20
34	Sim	800	<100	2000	300
35	Sim	60	30	200	50
36	Sim	60	<100	<100	50
37	Sim	30	30	400	20
38	Sim	680	910	3800	1150
39	Sim	290	150	800	510
40	Sim	2800	140	1400	1030
41	Sim	250	100	200	640

Amostras	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
42	Sim	240	40	1300	380
43	Sim	50	110	100	200
44	Sim	120	50	200	70
45	Sim	460	450	100	1900
46	Sim	180	170	100	1500
47	Sim	370	40	200	300
48	Sim	10	<100	200	10
49	Sim	200	600	2000	300
50	Sim	70	<100	<100	40
51	Sim	50	<100	<100	30
52	Sim	70	30	<100	<100
53	Sim	1900	900	1000	2600
54	Sim	5600	5200	5700	inc
55	Sim	1200	400	3000	2000
56	Sim	120	100	200	90
57	Sim	1350	80	700	160
58	Sim	20	<100	<100	20
59	Sim	160	10	<100	30
60	Sim	90	350	<100	230

Tabela 5. Resultados detalhados das detecções de *Salmonella* spp. pelas quatro técnicas de coleta de amostras.

Amostra	Inspeção	Lavagem superficial (Carcaça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
1	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
2	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
3	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
4	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
5	Não	ausência	Ausência	presença	presença
6	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
7	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
8	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
9	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
10	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
11	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
12	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
13	Não	presença	Ausência	ausência	ausência
14	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
15	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
16	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
17	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
18	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
19	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
20	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
21	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
22	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
23	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
24	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
25	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
26	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
27	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
28	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
29	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
30	Não	ausência	Ausência	ausência	ausência
31	Sim	ausência	Ausência	ausência	presença
32	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
33	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
34	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
35	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
36	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
37	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
38	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
39	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
40	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
41	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência

Amostra	Inspeção	Lavagem superficial (Carcça)	Swab de carcaça	Excisão de tecido	Excisão de Pele
42	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
43	Sim	presença	Ausência	ausência	ausência
44	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
45	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
46	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
47	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
48	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
49	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
50	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
51	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
52	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
53	Sim	ausência	Ausência	presença	ausência
54	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
55	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
56	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
57	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
58	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
59	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência
60	Sim	ausência	Ausência	ausência	ausência