

**MARIANE REZENDE DIAS**

**RASTREAMENTO MOLECULAR DE Salmonella SPP. E CONTAMINAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA NA LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE FRANGOS  
DE CORTE**

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  
2015**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

D541r  
2015 Dias, Mariane Rezende, 1990-  
Rastreamento molecular de *Salmonella* spp. e contaminação  
microbiológica na linha de abate e processamento de frangos de  
corte / Mariane Rezende Dias. – Viçosa, MG, 2015.  
xiv, 81f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luis Augusto Nero.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Contaminação microbiana. 2. *Salmonella*. 3. Alimentos  
de origem animal - Microbiologia. 4. Carne de ave.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 664.9397

MARIANE REZENDE DIAS

**RASTREAMENTO MOLECULAR DE *Salmonella* ssp. E CONTAMINAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA NA LINHA DE ABATE E PROCESSAMENTO DE  
FRANGOS DE CORTE**

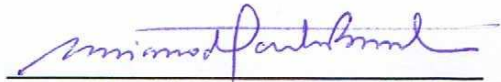
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de março de 2015.



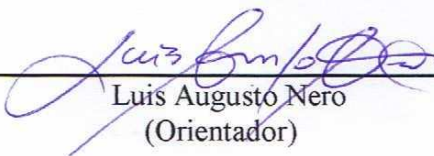
---

Paulo Sérgio de Arruda Pinto



---

Luciano dos Santos Bersot



---

Luis Augusto Nero  
(Orientador)

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”* Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar e amparar em todos os momentos, por me dar forças e não me deixar desistir!

À minha mãe Lili por ser a melhor mãe do mundo, por fazer o possível e impossível para me ver feliz e por ter me ensinado o valor do estudo desde criança.

Ao meu pai Lalado pelo exemplo de honestidade.

Às minhas irmãs, Marcinha, Mecinha e Mel, por serem meu porto seguro, por não medirem esforços para que meus sonhos se realizassem, e por serem as melhores irmãs que alguém poderia ter.

Aos meus irmãos, Maurinho e Marcelo, pelo apoio e ajuda em tudo que necessitei.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Natália e Valentina, por trazerem alegria e amor à minha vida.

Ao meu filhote de quatro patas, Pega Leve, pelo amor incondicional e verdadeiro.

Ao professor Nero, por todo o apoio e aprendizado durante todos esses anos e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao Fábio e ao Fred, pela ajuda indispensável durante as coletas de amostras desse projeto.

Ao Anderson e à Valéria, pela disposição em ajudar em vários momentos de desespero.

Aos colegas do InsPOA e da Preventiva, Mococa, Luana, Rodrigo, Danilo, Monique, Natália, Japa, Aline, Raquel, Juliana, Otávio, Camilla, Letícia, Pedro (“*in memoriam*”) pelo convívio diário, pela ajuda no trabalho, pelos momentos de diversão, e pela companhia nas cervejas.

Às minhas amigas, Marina e Natália, por estarem presentes desde o início dessa batalha e pela amizade sincera e verdadeira.

Aos amigos da VET 08, Bruninha, Theozinho, Tuany, Pablyo, Gesi, Carol, Thalitinha, Lara, Nikito, Camilla, que estão sempre presentes, mesmo distantes.

À minha amiga Lidiane, que Deus chamou para perto Dele, mas que está juntinha de mim, como um anjo no céu a me guiar... (*“Só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você...”*).

Às meninas da república GGD's, Sussu, Layla, Tatão, Ginger e Karinhinha, por terem sido muito mais que companheiras de casa, mas sim uma família com a qual eu vivi histórias inesquecíveis.

Às meninas do alojamento, Nay, Cris, Cristiana, Dani, Tatá, Mari, minha segunda família em Viçosa durante a graduação.

Aos meus amigos do Coluni, Leroy, Isa, Dani, Natty, Monique, Lays, Anderson, pela amizade e incentivo.

Aos estagiários que me ajudaram na construção desse trabalho, e sem os quais tudo seria mais difícil.

Ao professor Luciano Bersot, por ser tão solícito em responder meus questionamentos, pela ajuda no delineamento das análises e por aceitar o convite para participar da minha banca de defesa do mestrado.

Ao professor Paulo, pela ajuda no delineamento do experimento e por aceitar participar da minha banca de defesa do mestrado.

Aos servidores do departamento de veterinária, especialmente Dagô, Luiz, Rosi e Nívea, pela disposição em auxiliar em todos momentos de necessidade.

Aos matadouros de aves por abrirem as portas de seus estabelecimentos para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

A todos os colegas da pós graduação, por compartilharem suas experiências, pelo companheirismo em momentos de trabalho e diversão.

A Viçosa e à UFV, por serem um pedacinho do paraíso, no qual eu vivi 10 anos da minha vida, e onde fui muito bem acolhida.

Aos órgãos de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, pela oportunidade de realização desse trabalho.

A todos os amigos que fiz durante essa jornada, levo cada um no meu coração e nunca esquecerei como foram e são importantes para mim.

Por fim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1. Importância econômica da carne de frango .....	3
2. Fluxograma de abate de frangos .....	5
3. Controle de qualidade e inocuidade no processamento de carne de frango.....	7
4. A importância de Salmonella spp. na cadeia produtiva de frangos. ....	13
5. Métodos de caracterização de Salmonella spp.....	20
6. Referências Bibliográficas .....	24
OBJETIVOS .....	32
Objetivo Geral .....	32
Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 1. Contaminação microbiológica ao longo da linha de abate e processamento de frangos em Minas Gerais, Brasil. ....	33
Resumo .....	34
Abstract .....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	37
Matadouros e amostragem .....	37
Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene.....	39
Monitoramento do Cloro residual e Temperatura.....	39
Análises dos dados.....	40
Resultados e Discussão .....	40
Conclusão .....	46
Agradecimentos.....	47
Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 2. Rastreamento molecular de Salmonella spp. na linha de abate e processamento de frangos .....	57
Resumo .....	58
Abstract .....	59

Introdução.....	60
Material e Métodos.....	61
Matadouros e amostragem .....	61
Pesquisa de Salmonella spp. ....	63
Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	64
Análise dos dados .....	64
Resultados e Discussão .....	65
Conclusão .....	72
Agradecimentos .....	73
Referências Bibliográficas.....	73
CONCLUSÕES .....	82

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Fluxograma geral do abate de aves. ....6

### CAPÍTULO 2

Figura 1: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA usando XbaI dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos na etapa de recepção (caixas de transporte) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância). n: número de isolados .....79

Figura 2: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA usando XbaI dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos em diferentes etapas do abate (etapa 1: após depenagem, etapa 2: após evisceração, etapa 3: após pré-resfriamento-chiller final) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância). n: número de isolados .....80

Figura 3: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA, usando XbaI, dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos de ambiente de processamento (A, esteira) e cortes finais (B, asas) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância). n: número de isolados .....81

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Número de amostras e procedimentos de coletas em diferentes etapas do abate e processamento de frango em dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil. .... 50
- Tabela 2: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/cm<sup>2</sup> de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) nas caixas de transportes de frango de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2). .... 51
- Tabela 3: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em carcaças de frango após três diferentes etapas do abate em dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2). .... 52
- Tabela 4: Média ( $\pm$  desvio padrão) de valores encontrados para temperatura (°C) e teor de cloro (ppm) no final do tanque de pré-resfriamento (chiller final) de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2). .... 53
- Tabela 5: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/cm<sup>2</sup> de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em amostras do ambiente de processamento de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2). .... 54
- Tabela 6: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em amostras cortes finais de frangos em dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2). .... 55
- Tabela 7: Frequência de carcaças em três pontos distintos de dois matadouros (Mt1 e Mt2) que apresentaram médias de contaminação superior ao parâmetro estabelecido (média acrescida de desvio padrão). .... 56

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Número de amostras e procedimento de coletas em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne de frango em dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil. .... 77
- Tabela 2: Frequência de resultados positivos para Salmonella spp. obtidos de diferentes fontes de dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados em Minas Gerais, Brasil. .... 78

## RESUMO

DIAS, Mariane Rezende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Rastreamento molecular de Salmonella spp. e contaminação microbiológica na linha de abate e processamento de frangos de corte.** Orientador: Luís Augusto Nero.

A obtenção de alimentos com padrões de inocuidade e qualidade microbiológica é essencial, uma vez que alimentos contaminados estão frequentemente envolvidos em casos de enfermidades de origem alimentar. Nesse contexto, destaca-se a importância da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e também de patógenos nas diferentes etapas da linha de abate e processamento. A pesquisa de Salmonella spp. é fundamental na cadeia produtiva de frangos, pelo fato desse patógeno ser frequentemente associado a esse alimento e à grande maioria das gastroenterites. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica das carcaças e cortes de frango e do ambiente de abate em diferentes pontos das linhas de processamento de dois estabelecimentos industriais, através da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e da pesquisa de Salmonella spp., bem como traçar as principais rotas de contaminação por esse patógeno através da identificação dos perfis genéticos dos isolados obtidos. Foram obtidas 277 amostras em dois matadouros de aves (Mt1-grande porte e Mt2-pequeno porte) localizados em Minas Gerais, Brasil, e consistiam de carcaças de frangos em três etapas distintas do abate (após depenagem-C1, após evisceração-C2, após pré-resfriamento-C3) e cortes finais (coxa, asa, peito) usando a metodologia de enxágue, e amostras de superfície (400cm<sup>2</sup>) de caixas de transportes de aves, esteiras de cortes, mãos de funcionários e facas. As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para pesquisa de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e Escherichia coli, e também à detecção de Salmonella spp. de acordo com a ISO 6975, e os isolados suspeitos foram confirmados por PCR pela identificação dos genes ompC e sifB. Ainda, todos os isolados confirmados como Salmonella spp.

foram submetidos à macro-restrição por XbaI e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Para as caixas de transporte, as contagens médias obtidas para todos os indicadores de higiene e a frequência de amostras positivas para *Salmonella* spp. não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os matadouros estudados. Observou-se também que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de contaminação entre as carcaças coletadas nas etapas C1 e C2 para nenhum dos indicadores estudados, nem para *Salmonella* spp. No entanto, constatou-se que as médias de contaminação bem como a frequência de amostras positivas para *Salmonella* spp. encontradas nas duas primeiras etapas no Mt1 foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aquelas encontradas no Mt2, e ainda houve uma redução significativa dos níveis de contaminação de todos os indicadores de higiene e do patógeno entre as etapas C1-C2 e C3 em ambos os matadouros ( $p < 0,05$ ). As médias de contaminação para os cortes amostrados foram significativamente maiores em Mt2 do que em Mt1 ( $p < 0,05$ ), o mesmo ocorrendo para as superfícies amostradas; entretanto, para essas amostras não foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a frequências de amostras positivas para *Salmonella* spp. Os resultados obtidos demonstraram a maior contaminação nas etapas iniciais de abate, bem como o maior controle na etapa de pré-resfriamento. Os resultados da macro-restrição para os isolados obtidos de caixas de transporte permitem observar diferentes perfis genéticos, indicando uma contínua inclusão de novas cepas de *Salmonella* spp. no matadouro proveniente das granjas de produção das aves. Nas etapas de abate, observou-se que isolados obtidos em diferentes etapas e/ou em diferentes lotes apresentaram perfis genéticos idênticos, evidenciando a persistência desses isolados entre os animais obtidos de diferentes granjas. Além disso, demonstrou-se que isolados obtidos na etapa de recepção (caixas de transporte) apresentaram perfis genéticos idênticos a isolados obtidos na etapa de abate e cortes finais. Assim, foi possível identificar as principais etapas da linha de abate e

processamento de frangos envolvidas na contaminação por micro-organismos indicadores, e também traçar as possíveis rotas de contaminação por *Salmonella* spp., o que pode ser útil na determinação de medidas de controle por esses estabelecimentos.

## ABSTRACT

DIAS, Mariane Rezende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Molecular tracking of Salmonella spp. and microbiological contamination during slaughtering and processing of poultry.** Advisor: Luís Augusto Nero.

Obtaining feedstuffs with high safety and high microbiological standards is essential since contaminated feedstuffs are commonly involved in cases of foodborne diseases. In this context, the importance of studies regarding hygiene indicator microorganisms is highlighted, as well as pathogens in different stages of the production chain. Research about Salmonella spp. is fundamental during slaughtering and processing of poultry due to the fact that these pathogens are often associated with feed and most cases of gastroenteritis. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of carcasses and cuts of chickens and the slaughtering environment at different points in the processing line at two industrial establishments through the study of hygiene indicator microorganisms and Salmonella spp., as well as to trace the main contamination routes by this pathogen through the identification of the gene profile from the isolates. 277 samples were obtained from two poultry slaughter houses (Mt1 - large size and Mt2 - small size) located in the Minas Gerais state, Brazil, and they consisted of poultry carcasses at three distinct slaughter steps (after de-feathering - C1, after evisceration - C2, after pre-cooling - C3) and final cuts (thigh, wing, breast) using the rinsing methodology; samples were also obtained from the surface (400 cm<sup>2</sup>) of the shipping boxes of chickens, cutting mats, hands of employees, and knives. The samples were subjected to laboratory analyses for the evaluation of mesophiles, enterobacteria, total coliforms, and Escherichia coli, as well as the detection of Salmonella spp. according to ISO 6975; the suspect isolates were confirmed by PCR through identification of genes ompC and sifB. Furthermore, all isolates that were confirmed as Salmonella spp. were subjected to macro-restriction by XbaI and pulsed-field gel

electrophoresis (PFGE). For shipping boxes, the average counts that were obtained for all hygiene indicators and the frequency of positive samples for *Salmonella* spp. did not present with significant differences ( $P < 0.05$ ) among the slaughterhouses that were studied. Also, there were no significant differences ( $P < 0.05$ ) of contamination observed among carcasses that were collected in steps C1 and C2 for any indicator that was studied; the same result was observed for *Salmonella* spp. However, the average contamination as well as the frequency of positive samples for *Salmonella* spp. that was found in the two first steps for S11 were greater ( $P < 0.05$ ) than those found for S12; also, there was a significant reduction in the contamination levels from all hygiene and pathogen indicators between steps C1-C2 and C3 for both slaughterhouses ( $P < 0.05$ ). The average contamination for the sampled cuts was greater for Mt2 than Mt1 ( $P < 0.05$ ), which was similarly observed for the sampled surfaces; although, for these samples, significant differences were not found ( $P < 0.05$ ) in relation to the frequencies of positive samples for *Salmonella* spp. The results showed that there was greater contamination in the initial slaughter steps, such that greater control is necessary for the pre-cooling step. PFGE of the isolates that were obtained from the transport cages allowed us to observe different gene profiles, thereby indicating a continuous inclusion of new strains of *Salmonella* spp. in slaughterhouses from poultry production farms. In the slaughtering steps, the isolates that were obtained in different steps and/or different lots presented with identical PFGE profiles, which was evidence of the persistence of these isolates among animals obtained from different farms. Moreover, the isolates that were obtained in the reception step (shipping boxes) presented with identical PFGE profiles to those that were obtained in the slaughtering steps and end cuts. Therefore, it was possible to identify the main steps during slaughtering and processing of poultry that were involved in the contamination based on the indicator microorganisms and to

trace the possible routes of contamination by *Salmonella* spp., which can be useful to determine control measures for these establishments.

## INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura brasileira apresenta grande destaque no cenário mundial, posicionando o Brasil como o terceiro maior produtor e maior exportador de carne de frango. Para garantir que a avicultura continue sendo uma atividade econômica de destaque no país, é importante que os produtos cárneos oriundos das aves sejam obtidos de acordo com padrões de qualidade e inocuidade, o que pode ser feito através do monitoramento de parâmetros de qualidade e higiene nas diversas etapas de produção, com o objetivo de garantir um alimento seguro ao consumidor, destacando-se a pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e de patógenos.

Diferentes grupos microbianos podem ser utilizados como indicadores de higiene, como os micro-organismos aeróbios mesófilos que indicam as condições higiênicas durante todas as etapas do abate e processamento das aves, e os coliformes, enterobactérias e *Escherichia coli* que indicam contaminação de origem entérica. Assim, ressalta-se a importância dos micro-organismos indicadores como forma de monitorar os níveis de higiene durante toda a produção, uma vez que a sua presença em altas quantidades sugere deficiência nos procedimentos higiênicos, bem como nos procedimentos tecnológicos adotados.

Em relação a micro-organismos patogênicos, *Salmonella* spp. merece uma maior atenção por ser uma das principais causadoras de infecção alimentar, sendo muitas vezes relacionada ao consumo de carne de frango contaminada. Nesse contexto, a caracterização precisa das fontes originais de contaminação por *Salmonella* spp. é fundamental para aplicação de medidas de controle. Várias etapas da cadeia produtiva de frangos de corte podem ser consideradas como pontos de contaminação por esse patógeno. Na etapa de criação existem várias fontes de contaminação das aves vivas por *Salmonella* spp., incluindo os animais portadores assintomáticos, água e alimentos,

insetos, roedores, animais domésticos, dentre outros. No abate, praticamente todas as etapas podem contribuir para a contaminação de carcaças de aves por *Salmonella* spp., com destaque para as etapas de evisceração, onde rupturas de alças intestinais podem ocorrer e conseqüente contaminação. Adicionalmente, a etapa de pré-resfriamento em tanques facilita a contaminação cruzada entre carcaças. Mesmo após o abate, contaminação cruzada de *Salmonella* spp. pode ocorrer durante a manipulação e preparo das carcaças e cortes cárneos, passando a apresentar relevante papel na transferência desse patógeno para alimentos nas residências dos consumidores.

Dessa forma, a identificação desses pontos de contaminação por *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de frangos é fundamental para garantia de obtenção de produtos finais inócuos, e permitir ações direcionadas de profissionais durante as diferentes etapas da cadeia produtiva com o objetivo de minimizar os riscos de contaminação. Nesse aspecto, as ferramentas moleculares vêm ganhando destaque, uma vez que as técnicas tradicionais apresentam algumas dificuldades, e as técnicas moleculares apresentam a vantagem de serem mais rápidas, e algumas vezes, mais precisas, podendo ser utilizadas para caracterização de um grande número de isolados. Assim, essas técnicas podem ser usadas em estudos comparativos que visam identificar as características em isolados de *Salmonella* spp. obtidos em cadeias produtivas de frango de corte com diferentes condições de produção, auxiliando na identificação das principais fontes de contaminação em cada uma delas.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CARNE DE FRANGO

A pecuária mundial vem passando por mudanças significativas em sua composição, enquanto observa-se um declínio gradual do crescimento do setor de bovinos e suínos, a produção de aves apresenta-se como uma atividade em expansão, crescendo numa média de 3% ao ano (FAO, 2014). Segundo projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), esse crescimento deve continuar nos próximos anos, tendo sido projetada uma taxa de crescimento para a carne de frango no país de 3,9% ano, no período de 2013 a 2023 (Brasil, 2013a).

A partir das décadas de 1960 e 1970, a avicultura brasileira passou por diversas modificações em seu processo produtivo, deixando de ser predominantemente artesanal e passando a figurar uma avicultura moderna, comparada à avicultura artesanal existente. A modernização foi alcançada através das mudanças na estrutura produtiva de frangos, com avanços significativos do melhoramento genético dos animais, manejo adequado, sanidade, alimentação balanceada, automatização das atividades, além da integração da produção (Belusso & Hespanhol, 2010; Brasil, 2014; Fernandes Filho & Queiroz, 2002; Lazzari, 2004). Essa integração, denominada vertical, foi considerada o primeiro passo para a modernização da avicultura, e consiste da integradora (empresa) fornecer ao integrado (produtor rural) a ave de um dia, a ração para alimentação das aves e assistência técnica. Em contrapartida, o integrado se compromete a construir o aviário, instalar os equipamentos necessários, e a entregar as aves à integradora quando as mesmas apresentarem o peso apropriado para o abate, de acordo com as normas de bem-estar animal, biosseguridade e sanidade. Todas as etapas desse processo devem ser monitoradas pelas empresas integradoras, o que permite a rastreabilidade do produto da

granja à mesa do consumidor. Assim, ocorre uma cooperação entre os produtores integrados e a indústria na etapa de criação das aves (ABPA, 2014; Fernandes Filho & Queiroz, 2002; Richetti et al., 2002; Rodrigues et al., 2014).

A Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) estima que 90% da avicultura industrial brasileira estejam sob o sistema integrado (ABPA, 2014). E essa parceria entre indústria e avicultores contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, resultando em reduzidos custos de transação e na qualidade, que atende às demandas de todo o mundo, e faz com que o Brasil conquiste os mais exigentes mercados (Brasil, 2014).

Com todos esses avanços e melhorias apresentadas pelo setor, a ABPA divulgou que a produção brasileira de carne de frango em 2013 foi de 12,3 milhões de toneladas, mantendo o Brasil como um dos três maiores produtores mundiais de carne de frango, com Estados Unidos e China (UBABEF, 2014). Desse total, cerca de 69% permanecem no mercado interno, o que confirma o potencial dessa atividade para fortalecer a economia do país. Em complementação, o Brasil mantém desde 2004 a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2013 com a marca de 3,9 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. Esse crescimento da produção de carne de frango brasileira é impulsionado principalmente pelo aumento do consumo de carne de frango no país, e pelo aumento nas exportações (Rodrigues et al., 2014). O MAPA ainda prevê uma taxa de crescimento nas exportações de 1,6% para a carne de frango nos próximos anos (Brasil, 2013a).

Dentre os estados brasileiros, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os maiores produtores e exportadores de carne de frango; o estado de Minas Gerais também apresenta destaque, sendo responsável por 7,56% dos frangos abatidos no território nacional, e 4,78% das exportações em 2013. Os principais países importadores da carne de frango brasileira encontram-se no Oriente Médio (com destaque para a

Arábia Saudita), na Ásia (com destaque para o Japão e Hong Kong) e na África, ao apresentarem em 2013 os volumes de importação de 1,447 milhão de toneladas, 1,118 milhão de toneladas e 524 mil toneladas, respectivamente (UBABEF, 2014).

Segundo dados da ABPA, a avicultura emprega no Brasil mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Além disso, a avicultura apresenta uma grande importância social, já que se observa sua presença maciça no interior do país, principalmente nos estados das regiões Sul e Sudeste, sendo a principal atividade econômica em muitas cidades. Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores no Brasil e no mundo, sendo o consumo per capita no país aproximadamente de 41,8 Kg/ano (ABPA, 2014). Em comparação, o consumo per capita de carne bovina foi de aproximadamente 39, 2 Kg no ano de 2014, e o de carne suína de aproximadamente 14,5 Kg no ano de 2013 (ABIEC, 2015; ABPA, 2015).

## **2. FLUXOGRAMA DE ABATE DE FRANGOS**

Apesar de pequenas variações poderem ocorrer de acordo com a realidade de cada estabelecimento, em geral, a linha de abate e processamento de frangos segue as diretrizes apresentadas pela Portaria nº 210 de 1998 do MAPA, que estabelece o Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. De modo geral, o abate de frangos pode ser resumido nas etapas apresentadas no Fluxograma a seguir (Figura 1). Outras etapas como processamento de miúdos e pés, bem como corte e desossas das carcaças também estão presente na maioria dos estabelecimentos.

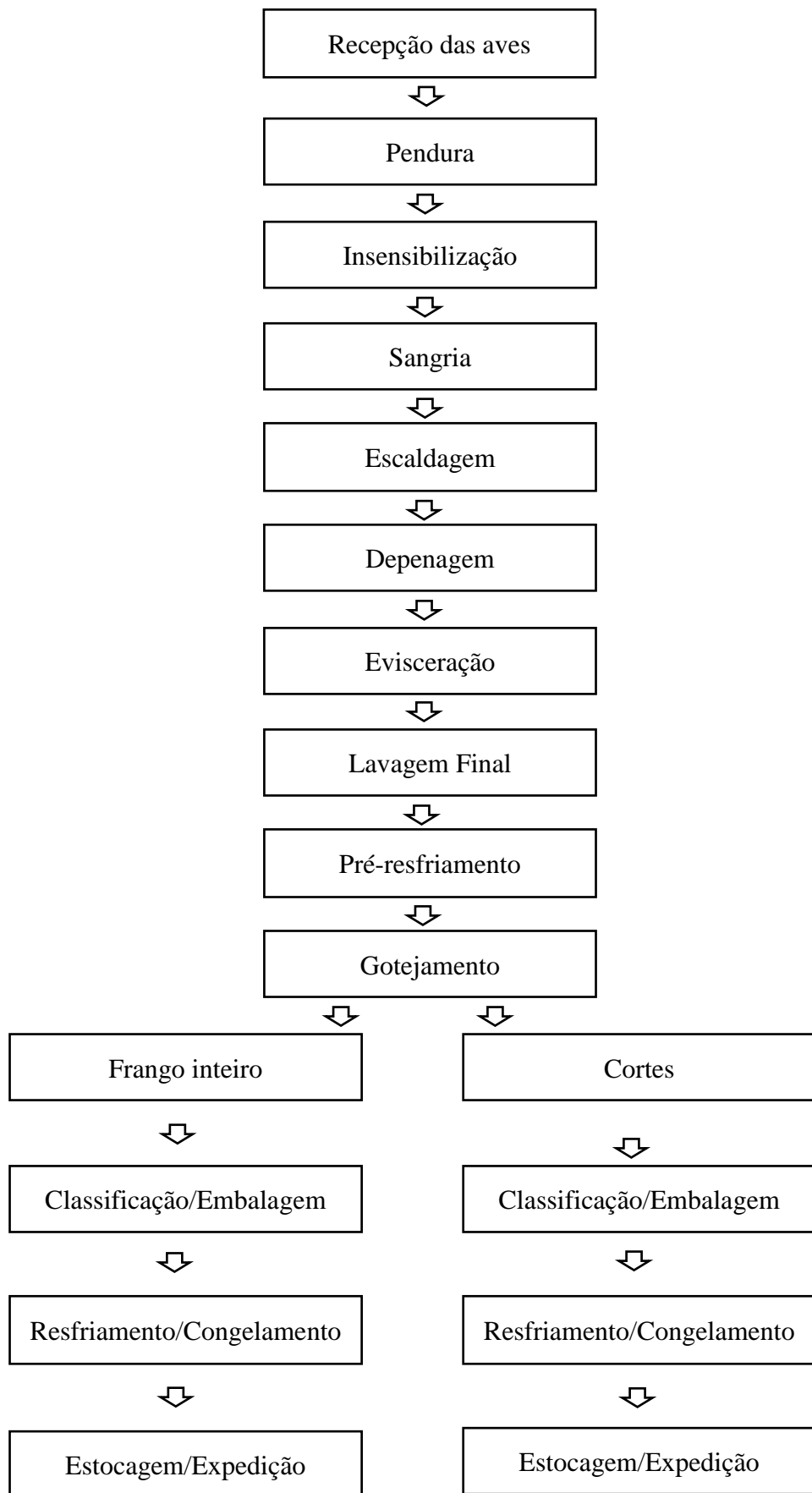


Figura 1: Fluxograma geral do abate de aves.

### **3. CONTROLE DE QUALIDADE E INOCUIDADE NO PROCESSAMENTO DE CARNE DE FRANGO**

A fim de garantir que a avicultura continue sendo uma atividade econômica de destaque no Brasil, é importante que os produtos oriundos dessa atividade sejam produzidos de acordo com padrões de qualidade e inocuidade, o que pode ser feito através do monitoramento de parâmetros de qualidade e higiene nas diversas etapas de produção, com o objetivo de garantir um alimento seguro ao consumidor. Apesar de diversos fatores poderem afetar a segurança alimentar, a discussão concentra-se em micro-organismos patogênicos que estão associados com doenças de origem alimentar, que são responsáveis anualmente por inúmeros casos de enfermidades e mortes em todo o mundo.

Os principais sintomas decorrentes das doenças de origem alimentar incluem náusea, vômito, diarreia, febre, podendo ocorrer minutos ou até semanas depois da ingestão do alimento contaminado. Muitas vezes é uma doença auto limitante, na qual os indivíduos acometidos se curam em poucos dias; no entanto, podem surgir complicações, principalmente em crianças, idosos, gestantes e pessoas com o sistema imunológico comprometido (Donnenberg & Narayanan, 2013; Kirk et al., 2014; USDA, 2014).

Dessa forma, a inocuidade alimentar é uma questão importante de saúde pública, e as doenças de origem alimentar geram um considerável gasto público. Como exemplo, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estima que a cada ano cerca de um em cada seis norte-americanos (ou 48 milhões de pessoas) ficam doentes, 128 mil são hospitalizadas e 3.000 morrem em decorrência de doenças de origem alimentar (CDC, 2014). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2011 ocorreram 795 surtos de enfermidades de origem alimentar, resultando em quase 20.000

peças doentes (Brasil, 2013b). Entretanto, esses indicadores certamente são subestimados, principalmente quando comparado aos dados provenientes dos Estados Unidos, o que pode ser explicado pelas limitações do Sistema de Vigilância em Saúde apresentado no Brasil.

Para evitar, ou pelo menos diminuir, a incidência de casos de doenças de origem alimentar, é fundamental que os órgãos de saúde pública, assim como as indústrias e os consumidores, conheçam os principais alimentos envolvidos na veiculação de micro-organismos patogênicos. Além disso, o conhecimento das principais etapas que podem contaminar o alimento durante toda a cadeia de produção é fundamental para a adoção de medidas preventivas eficazes, a fim de evitar ou diminuir a recorrência desse problema.

Considerando que existem medidas preventivas para a maioria das doenças de origem alimentar, um sistema eficiente de investigação e notificação de surtos de origem alimentar pode fornecer informações importantes a fim de ajudar a reduzir a ocorrência dessas enfermidades, uma vez que podem oferecer informações sobre patógenos e alimentos envolvidos, além de outros fatores que contribuem para sua ocorrência, e assim auxiliar o sistema de vigilância no estabelecimento de medidas preventivas (CDC, 2014; Donnenberg & Narayanan, 2013).

Entretanto, por ser uma doença auto limitante, muitos casos não são reportados ou investigados, e por isso podem ser encontrados estudos em diversos países nos quais são realizadas estimativas de casos de doenças de origem alimentar, hospitalizações e mortes ocorridas em decorrência desse problema, sendo os mesmos importantes para estimar a dimensão real do problema e assim estabelecer medidas preventivas eficazes (Havelaar et al., 2012; Kim et al., 2015; Kirk et al., 2014). Uma forma de garantir um alimento com qualidade e risco microbiológico reduzido é pelo monitoramento

realizado na cadeia produtiva, podendo destacar a pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e também a pesquisa de micro-organismos patogênicos.

Vários micro-organismos podem ser usados para indicar os níveis de higiene durante as etapas da produção, como os aeróbios mesófilos, coliformes totais, enterobactérias e *Escherichia coli*. Os micro-organismos aeróbios podem ser utilizados como indicadores das condições higiênicas gerais durante todo o processo de produção, enquanto enterobactérias, coliformes e *E. coli* podem ser usadas como indicadores de contaminação de origem entérica (Ghafir et al., 2008; Milios et al., 2014). Apesar de usualmente se fazer a associação de micro-organismos indicadores de higiene à presença de patógenos, essa correlação não é comprovada, devendo os dados de indicadores microbiológicos serem usados para avaliar as tendências gerais no processo de higiene do abate, a fim de tomar as medidas corretivas, e avaliar os controles de qualidade do estabelecimento (Milios et al., 2014). Nesse contexto, considerando que várias etapas do abate podem promover a contaminação das aves, e que a redução dessa contaminação é um desafio para os estabelecimentos, as melhorias implantadas em cada um podem ser monitoradas através dos indicadores bacterianos (Ghafir et al., 2008).

O único parâmetro relacionado a micro-organismos indicadores existente para carne de aves no Brasil é descrito na RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determina que carnes resfriadas, ou congeladas, "in natura", de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) apresente os seguintes parâmetros para Coliformes a 45°/g:  $n = 5$ ,  $c = 3$ ,  $m = 5 \times 10^3$  UFC/g,  $M = 10^4$  UFC/g (Brasil, 2001a). Devido à ausência de critérios mais específicos, os estabelecimentos industriais usualmente consideram como referência parâmetros internacionais, muitas vezes dos países importadores, como critérios de qualidade e segurança de seus produtos. Dessa forma, os critérios de seus principais clientes são atendidos, e é possível a manutenção de acordos comerciais firmados.

Considerando que os micro-organismos indicadores de higiene não são bons indicativos da presença de patógenos, a pesquisa desses últimos também é fundamental para a garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos, e também para atendimento das exigências internacionais quanto ao controle de micro-organismos patogênicos. Apesar de diversos patógenos serem relacionados a doenças de origem alimentar, *Salmonella* spp. se destaca em todo o mundo, sendo geralmente transmitida aos seres humanos através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente carne, aves, ovos e leite (WHO, 2014). Segundo o CDC, os cinco principais patógenos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos incluem o norovírus, seguido de quatro patógenos bacterianos (*Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*) (CDC, 2014).

Como constatação da importância da *Salmonella* spp., cerca de 42.000 casos de salmonelose são relatados todos os anos nos Estados Unidos; entretanto, esse número pode ser ainda maior, uma vez que muitos casos não são diagnosticados ou relatados (CDC, 2014). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais envolvido nas doenças de origem alimentar notificadas e investigadas, tendo sido responsável por 1.522 surtos entre 2000 a 2013 (Brasil, 2013b).

Considerando a dificuldade de se encontrar estudos ou dados consistentes do sistema de vigilância a respeito de casos de gastroenterite, Majowicz et al. (2010) realizaram um estudo no qual fizeram estimativas mundiais de casos de gastroenterite envolvendo *Salmonella* não-tifóide, e encontraram como resultado um dado de 93.757.000 de casos e 155.000 mortes a cada ano em todo o mundo. Embora os dados específicos sobre enfermidades associadas ao consumo de carne de aves contaminadas por *Salmonella* spp. sejam limitados, o papel das aves é considerado significativo; no entanto, o risco em diferentes países varia de acordo com as medidas de controle e

práticas implementadas ao longo da cadeia de produção primária até a final para preparação da carne para o consumo (FAO/WHO, 2011).

Objetivando atender as exigências de segurança do alimento e visando à inocuidade dos alimentos produzidos, mediante o controle do sistema de produção, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 70, em 06 de outubro de 2003, na qual institui o “Programa de Redução de Patógenos e Monitoramento Microbiológico e Controle de Salmonella sp. em Carcaças de Frangos e Perus” (Brasil, 2003a). Esse programa foi implementado com o objetivo de construir um sistema de informações sobre a contaminação por micro-organismos patogênicos para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção ao agente, o que permite a melhor eficiência das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (ARM). Essa instrução normativa prevê a análise de 51 amostras a cada ciclo amostral, sendo aceitável no máximo 12 amostras positivas, sendo que o processo de tomada de amostras em cada ciclo relaciona-se com o volume de abate de cada estabelecimento industrial, e as amostras colhidas imediatamente após o gotejamento e antes da embalagem primária (Brasil, 2003a). Após implantação desse programa, uma nota técnica foi divulgada com os resultados gerados desde outubro de 2003 até julho de 2008: dentro desse período foram coletadas e analisadas 128.293 amostras de carcaças de aves, e os resultados encontrados indicaram um valor de 6,39% de amostras positivas para Salmonella spp. em carcaças de aves coletadas nos estabelecimentos sob Inspeção Federal (Brasil, 2008).

Além do Programa de Redução de Patógenos, o Sistema de Inspeção Brasileiro é constituído de diversos outros programas que visam produzir um alimento inócuo e seguro do ponto de vista microbiológico, garantindo assim proteção à saúde pública e exportação dos produtos para países cada vez mais exigentes. Nesse sentido, o modelo

de inspeção sanitária atualmente baseia-se na avaliação da implantação e execução dos Programas de Autocontrole da empresa inspecionada, que por sua vez fundamentam-se na inspeção contínua e sistemática de todos os fatores que, de alguma forma, podem interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos expostos ao consumo. Fazem parte dos Programas de Autocontrole da os programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) (Brasil, 2005).

O programa APPCC, instituído pela Portaria nº 46 de 10 de fevereiro de 1998 do MAPA, baseia-se na prevenção, eliminação ou redução dos perigos em todas as etapas da cadeia produtiva, sendo um sistema de análise que identifica perigos específicos e medidas preventivas para seu controle, objetivando a segurança do alimento (Brasil, 1998). Esse programa tem como pré-requisito os programas de BPF e PPHO, sendo que o BFP se baseia na higiene do estabelecimento, higiene pessoal e higiene da produção (Brasil, 1997), enquanto o PPHO se baseia na segurança da água, higiene das superfícies de contato com o alimento, prevenção contra a contaminação cruzada, higiene dos empregados, proteção contra contaminantes e adulterantes do alimento, identificação e estocagem adequadas de substâncias químicas e de agentes tóxicos, saúde dos empregados, e controle integrado de pragas (Brasil, 2003b).

Além dos programas de controle adotados pelo MAPA, a ANVISA aprovou por meio da RDC 13 de 02 de janeiro de 2001, o Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados (Brasil, 2001b), considerando a natural presença de *Salmonella* spp. em carne de aves e os riscos que esse patógeno representa aos consumidores. A RDC 13 estabelece a obrigatoriedade de instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carnes de aves e seus miúdos crus que auxiliem o

consumidor no controle do risco associado ao consumo de alimentos nos quais a *Salmonella* spp. possa estar presente. As instruções obrigatórias são:

Este alimento se manuseado incorretamente e ou consumido cru pode causar danos à saúde; Mantenha refrigerado ou congelado; Descongele somente no refrigerador ou no micro-ondas; Mantenha o produto cru separado dos outros alimentos; Lave com água e sabão as superfícies de trabalho (incluindo as tábuas de corte), utensílios e mãos depois de manusear o produto cru; Consuma somente após cozido, frito ou assado completamente (Brasil, 2001b).

#### **4. A IMPORTÂNCIA DE *SALMONELLA* SPP. NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS.**

*Salmonella* spp. são bacilos Gram negativos, e segundo o esquema de Kauffman-White-Le Minor, sua classificação pode ser feita em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. *S. enterica* deve ser dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Ainda, mais de 2000 sorovares são descritos para esse micro-organismo (Guibourdenche et al., 2010; Jay et al., 2005). As cepas mais frequentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e são responsáveis por 99% das salmoneloses humanas (Silva et al., 2007). Entretanto, a classificação de *Salmonella* spp. em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida e utilizada a nomenclatura relacionada com a sorotipagem baseada nas diferenças encontradas em certas estruturas superficiais das células, que são antigênicas. Essas estruturas são o envelope celular ou cápsula (antígenos capsulares “Vi”), a parede celular (antígenos somáticos “O”) e os flagelos (antígenos flagelares “H”) (Silva et al., 2007). Ainda, os diferentes sorotipos podem ser

classificados em: a) aqueles que infectam somente humanos (exemplo: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C*); b) aqueles que são adaptados a algum hospedeiro (exemplo: *S. Gallinarum* em aves, *S. Choleraesuis* em suínos); c) aqueles que não tem hospedeiros preferenciais, sendo patogênicos para humanos e animais, e onde se incluem a maioria dos sorotipos veiculados por alimentos (exemplo: *S. Typhimurium*) (Jay et al., 2005). Já Sánchez-Vargas et al. (2011) considera a classificação apenas em tifoide, que abrange *S. Typhi* e *S. Paratyphi* e causam a febre entérica, sendo veiculadas por água ou alimentos contaminados por fezes humanas e não-tifóide, que abrange os outros sorotipos.

O presente trabalho concentra-se nos principais sorotipos causadores de gastroenterite humana, na maioria das vezes associados a alimentos contaminados. Esses sorotipos podem muitas vezes se adaptar a diversos hospedeiros animais, fazendo parte de sua microbiota intestinal sem, no entanto, causar alterações patológicas.. O problema ocorre quando os alimentos produzidos por esses animais portando diversos sorotipos de *Salmonella* spp. são consumidos pelo ser humano, podendo resultar numa doença de origem alimentar, representando assim um perigo para os consumidores. Assim, existe uma alta correlação entre os sorotipos encontrados em animais de produção clinicamente saudáveis e aqueles isolados de seres humanos doentes (Callaway et al., 2008).

Os sintomas iniciais mais comuns decorrentes de uma gastroenterite causada por *Salmonella* spp. incluem náuseas, vômitos, diarreia, podendo haver febre, calafrios, dor abdominal, mialgias e dor de cabeça (Hue et al., 2011; Sánchez-Vargas et al., 2011). O período de incubação desse patógeno varia de 12 a 72 horas e a infecção causada por *Salmonella* spp. é geralmente auto limitada, e na maioria das vezes não levam a complicações, exceto em pacientes de idades extremas ou com o sistema imunológico comprometido (CDC, 2014; Sánchez-Vargas et al., 2011).

A transmissão de *Salmonella* spp. aos seres humanos pode ocorrer por contato direto com os animais portadores ou pelo consumo de alimentos e água contaminados. No caso de alimentos contaminados, as aves e os produtos avícolas exercem um papel importante na veiculação desse patógeno, sendo muitas vezes incriminados nos surtos de salmonelose humana (Hue et al., 2011; Sánchez-Vargas et al., 2011; Yildirim et al., 2011).

Pelo fato de *Salmonella* spp. sobreviver no trato intestinal dos animais sem causar doenças, inclusive das aves, esse patógeno representa uma séria ameaça à inocuidade alimentar, uma vez que pode se perpetuar no próprio aviário através da transmissão vertical, ou mesmo através de transmissão horizontal com alimentos, água e ambiente contaminados com fezes de animais portadores (Callaway et al., 2008). Além disso, o transporte e o estabelecimento de abate também exercem papel importante na disseminação do patógeno, através da contaminação cruzada, e dessa forma, a contaminação das aves e dos produtos avícolas podem ocorrer durante toda a cadeia de produção (Heyndrickx et al., 2002).

Diversos estudos demonstram a importância da produção primária na manutenção e disseminação de *Salmonella* spp. na cadeia produtiva. A criação intensiva, com consequente elevada densidade de animais nas propriedades de criação, é um dos principais fatores que favorecem a disseminação de micro-organismos através da contaminação do ambiente com fezes de animais (Alvarez-Fernandez et al., 2012; Antunes et al., 2003). A limpeza e desinfecção ineficazes do aviário podem fazer com que o patógeno persista no ambiente (bebedouro, comedouro, cama de frango, paredes, pisos, etc), como encontrado por Nogrady et al. (2008) e também por Heyndrickx et al. (2002), podendo permitir assim a contaminação de lotes posteriores de frangos originalmente livres de *Salmonella* spp. Também existem outros reservatórios nas propriedades que podem favorecer a transmissão de *Salmonella* spp., dentre eles:

insetos, roedores, animais de fazenda, e o próprio ser humano (Callaway et al., 2008; Heyndrickx et al., 2002; Nogrady et al., 2008; Silva & Duarte, 2002). Além disso, o uso de ração e água contaminadas também pode ser considerado de importância na veiculação desse patógeno, já que pode introduzir esse micro-organismo numa propriedade inicialmente livre. Em seu estudo, Corry et al. (2002) encontraram que as fábricas de ração foram a fonte da maioria dos sorotipos de *Salmonella* spp. detectados em duas empresas avaliadas já que os sorotipos detectados na fábrica de ração foram os mesmos encontrados nas carcaças processadas demonstrando a importância da alimentação animal como fonte de contaminação desse patógeno em granjas. Com isso, observa-se a importância de uma biossegurança rigorosa, incluindo manutenção de plantéis livres de *Salmonella* spp., vazios sanitários corretos, estrita higiene, limpeza e desinfecção das propriedades de criação, tratamento térmico dos alimentos, acesso restrito aos aviários, controle de pragas, desinfecção da água, entre outras (Callaway et al., 2008; Corry et al., 2002; Silva & Duarte, 2002).

Outro ponto importante na cadeia de produção que favorece a disseminação de *Salmonella* spp. é o transporte dos aviários até os matadouros, uma vez que é uma atividade que envolve grande estresse, pois na maioria das vezes as aves são confinadas e aglomeradas em caixas por longas distâncias em condições inadequadas, o que implica numa maior possibilidade de contaminação cruzada (Nogrady et al., 2008; Tirolli & Costa, 2006). Além disso, Corry et al. (2002) e Rasschaert et al. (2007) observaram uma ineficiente limpeza e desinfecção das caixas de transporte, sendo frequentemente observado material fecal, além de terem detectado a presença de *Salmonella* spp., o que pode levar à permanência desse patógeno nesse material, favorecendo a contaminação de lotes subsequentes. Isso demonstra a necessidade de uma melhor atenção à limpeza e desinfecção de caixas de transporte, e provavelmente

dos veículos de transporte, pois também podem ser importantes fontes de contaminação durante o transporte e abate.

Já dentro do matadouro, algumas etapas envolvidas no processo de abate representam pontos críticos de possível contaminação da carcaça com *Salmonella* spp.; no entanto, esses pontos podem variar de acordo com os protocolos de higiene, limpeza e desinfecção adotados por cada estabelecimento (Von Rückert et al., 2009). Um ponto importante no matadouro é a qualidade da água utilizada, pois se esta estiver contaminada promoverá a contaminação das carcaças por toda a linha de abate. Uma evidência disso foi observado por Cortez et al. (2006a), que ao coletar amostras de água de escaldagem, da evisceração, do chiller, de água de lavagem de carcaças não evisceradas e evisceradas, encontraram alto níveis de *Salmonella* spp., demonstrando assim a importância da água na veiculação desse patógeno.

As etapas do abate de aves mais frequentemente relacionadas à contaminação microbiológica são a depenagem e a evisceração. A etapa de evisceração merece destaque devido à maior probabilidade de contaminação fecal em decorrência das possíveis rupturas intestinais (Rodrigues et al., 2008). Além disso, Hue et al. (2011) observaram que o número de pessoas trabalhando na evisceração influenciou na contaminação das carcaças por *Salmonella* spp., pois quando menos pessoas estavam na linha, maior foi a chance de contaminação devido ao trabalho repetitivo e falta de precaução. Outro fator considerado nesse estudo foi o fato da evisceração totalmente automática levar a um maior número de carcaças contaminadas que uma semi-automática, o que se deve à variação natural de tamanho entre as carcaças abatidas. Rasschaert et al. (2007) relataram que os equipamentos nas etapas de escaldagem e depenagem são mais contaminados que na etapa de evisceração, relacionando esse fato a uma menor contaminação ou maior limpeza e desinfecção na etapa de evisceração, ou

ainda à possível disseminação da *Salmonella* spp. presente nas penas das aves durante o processo de escaldagem e depenagem.

Estudos indicam que a etapa de pré-resfriamento apresenta controvérsias com relação a sua participação na contaminação das carcaças, pois ao mesmo tempo que pode retardar a multiplicação de bactérias deterioradoras e inibir o desenvolvimento de patógenos, devido à baixa temperatura e à hipercloração da água utilizada, pode também atuar na contaminação cruzada das carcaças (Rodrigues et al., 2008; Von Rückert et al., 2009). Von Rückert et al. (2009) encontraram menor frequência de *Salmonella* spp. nas carcaças na saída do pré-resfriamento quando comparada às etapas iniciais de abate; ainda, o pré-resfriamento parece ter sido o único ponto nesse estudo que exerceu controle sobre esse patógeno. Já Lopes et al. (2007) observaram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de água do pré-chiller, e também em uma carcaça antes do pré-chiller e em uma após o chiller, atribuindo isso às temperaturas inadequadas e cloração deficientes encontradas nos tanques de pré-resfriamento, permitindo assim a contaminação cruzada das carcaças.

Além das falhas de processamento durante o abate das aves, os equipamentos e utensílios também podem exercer papel fundamental na contaminação das carcaças, uma vez que uma higienização e uma desinfecção mal feitas podem levar à persistência de micro-organismos nos equipamentos, e conseqüente contaminação de carcaças de lotes subsequentes. Essa contaminação cruzada através dos equipamentos e utensílios da linha de abate foi observada em outros estudos (Olsen et al., 2003; Rasschaert et al., 2007). Com isso, pode ser determinado que os procedimentos operacionais na linha de abate e as condições higiênicas dos equipamentos e utensílios utilizados exercem grande influência na contaminação de carcaças de aves por *Salmonella* spp., e portanto, os estabelecimentos industriais devem estabelecer os pontos críticos de controle na sua linha de abate, tomando todas as medidas necessárias para minimizar a contaminação

das carcaças nesses pontos. Adicionalmente, a definição adequada dos PPHO é importante para prevenção da contaminação dos equipamentos e utensílios. Outra medida de controle que também deve ser considerada é a conscientização dos consumidores quanto ao correto manuseio dos alimentos, a fim de se prevenir a contaminação cruzada e também quanto ao correto consumo de carnes de aves, que não deve ser crua.

Considerando alguns estudos sobre ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, identifica-se que os sorotipos identificados variam de acordo com os países considerados, mas que pertencem principalmente aos sorotipos *S. Enteritidis* (Alvarez-Fernandez et al., 2012; Capita et al., 2003; Domínguez et al., 2002; Duarte et al., 2009; Hue et al., 2011; Tessari et al., 2008; Yildirim et al., 2011) e *S. Typhimurium* (Alvarez-Fernandez et al., 2012; Antunes et al., 2003; Rasschaert et al., 2007; Tirolli & Costa, 2006; Wang et al., 2013; Yildirim et al., 2011), frequentemente associados com gastroenterites humanas.

No Brasil, podem ser encontrados diversos estudos que demonstram a prevalência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos produzidas no país. Borsoi et al. (2010) encontraram 12% de positividade para *Salmonella* spp. em carcaças analisadas no Rio Grande do Sul, sendo a maior parte dos isolados sorotipados como *S. Enteritidis*. Resultado semelhante foi encontrado por Cortez et al. (2006b) em São Paulo, e por Moreira et al. (2008), em Goiás, que detectaram 16, 6% e 14, 32%, respectivamente, de amostras positivas, estando *S. Enteritidis* entre os principais isolados. Também foram encontrados estudos que demonstram uma frequência de *Salmonella* spp. inferior à encontrada por esses autores, como o estudo de Duarte et al. (2009), no Nordeste, que encontrou 9,5% de positividade entre as amostras analisadas, e de Tessari et al. (2008), em São Paulo, que encontrou 2,5% de amostras positivas. Por outro lado, resultados com frequência maior de amostras positivas foram encontrados por Ribeiro et al.

(2007), no Sul do país (39,3%), e por Santos et al. (2000), em São Paulo (32%). Nesses dois estudos, o principal sorotipo encontrado foi também *S. Enteritidis*. Pode-se observar que há uma variedade de frequência de amostras positivas entre os estudos realizados no país, o que pode ser reflexo das diferentes condições de abate encontradas em cada região, ou até mesmo em cada estabelecimento, entretanto, independente do resultado, fica evidente o problema da contaminação por esse patógeno nas carcaças de frangos produzidas no país, o que demonstra a necessidade de medidas a fim de controlar esse problema.

Adicionalmente, uma característica que merece destaque é a ocorrência de cepas de diferentes sorotipos que apresentam resistência múltipla a diversos antimicrobianos (Alvarez-Fernandez et al., 2012; Yildirim et al., 2011), demonstrando que além da possível gastroenterite, um problema ainda maior pode ocorrer se o sorotipo presente nesse alimento for resistente aos antimicrobianos eleitos para o tratamento. Conforme observado por Antunes et al. (2003), esses resultados não são totalmente inesperados devido à utilização intensiva de antimicrobianos na cadeia produtiva de aves de corte, o que pode contribuir para a disseminação de diferentes padrões de resistência. Dessa forma, esse fato deve ser considerado um problema adicional de saúde pública, demandando constante vigilância e conscientização para o uso prudente dos antimicrobianos.

## **5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE SALMONELLA SPP.**

No contexto mundial, no qual as doenças de origem alimentar são extremamente impactantes na saúde pública, se torna cada vez mais importante a caracterização dos isolados de *Salmonella* spp., uma vez que a tipagem definitiva pode ajudar a identificar a origem de um surto e assim, ser útil na adoção de medidas de

controle para reduzir a incidência de contaminação por patógenos em alimentos e, conseqüentemente, evitar casos de gastroenterites humana associados a alimentos (Steve Yan et al., 2003; Vongkamjan & Wiedmann, 2014).

O isolamento, seguido de sorotipagem, é a técnica tradicional de detecção de *Salmonella* spp., sendo um método cultural clássico de presença ou ausência, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis. Os procedimentos recomendados por diferentes órgãos reguladores, embora com algumas variações nos protocolos analíticos, seguem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas em qualquer tipo de alimento: pré-enriquecimento em caldo não seletivo, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento seletivo-diferencial, confirmação bioquímica e sorológica (Silva et al., 2007). O método de sorotipagem mais usado tradicionalmente leva em conta a variabilidade antigênica nos lipopolissacarídeos da membrana externa (Antígeno O), proteínas flagelares (antígenos H1 e H2) e polissacarídeo capsular (antígeno Vi) (Barco et al., 2013; Kim et al., 2015).

No entanto, apesar de útil, há diversos inconvenientes na sorotipagem tradicional, como uso de anti-soros com preço elevado, exigência de grande controle, de técnicos bem treinados, além de ser um método demorado, e ainda a existência de alguns isolados que não são tipáveis (Barco et al., 2013; Kim et al., 2015). Por essas e outras razões, métodos moleculares alternativos vem ganhando destaque por serem mais rápidos e confiáveis (Akiba et al., 2011; Alvarez et al., 2004; Liu et al., 2011; Steve Yan et al., 2003). A demanda por métodos rápidos e alternativos é ainda mais evidente considerando a grande quantidade de surtos de salmonelose em humanos envolvendo o consumo de carne de aves, podendo ter como objetivo rastrear toda a cadeia de produção a fim de se identificar a fonte de contaminação: a adoção de tais métodos é fundamental para as indústrias, pois proporciona várias vantagens importantes como

velocidade, especificidade, sensibilidade (O'Regan et al., 2008; Park et al., 2014; Vongkamjan & Wiedmann, 2014). Além de permitir uma melhoria na qualidade dos processos de diagnóstico, a adoção de metodologias rápidas pode também aprimorar o controle de qualidade microbiológica dos produtos, já que a obtenção dos resultados em poucas horas possibilita que as indústrias adotem ações corretivas que impeçam que um produto contaminado seja disponibilizado aos consumidores (Freitas et al., 2010).

Diversos métodos moleculares estão sendo estudados com o objetivo de identificar os sorotipos de *Salmonella* spp., sendo baseados em enzimas de restrição, amplificação de ácidos nucleicos ou sequenciamento de nucleotídeos (Barco et al., 2013; Steve Yan et al., 2003). As técnicas moleculares mais utilizadas atualmente para caracterização e identificação de diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR multiplex, PCR em tempo real, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e Multilocus Sequence Typing (MLST) (Liebana, 2002; Park et al., 2014; Steve Yan et al., 2003). Um método de sorotipagem ideal seria aquele que apresenta 100% de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade; entretanto, dificilmente uma metodologia irá atender perfeitamente a todos esses critérios (Ribot et al., 2006). Cada metodologia possui suas vantagens e desvantagens, determinando que a definição do procedimento mais adequado seja determinada por diversos fatores como quantidade de amostras, tempo e recursos materiais e humanos disponíveis (Barco et al., 2013; Park et al., 2014; Steve Yan et al., 2003).

Considerando a necessidade de técnicas rápidas e precisas para o diagnóstico e caracterização de *Salmonella* spp. em alimentos, vários estudos podem ser encontrados com desenvolvimento de métodos de sorotipagem molecular através do uso de PCRs multiplex, onde vários pares de primers específicos a determinados sorotipos são usados em uma mesma reação. Kim et al. (2015) desenvolveram duas reações de PCRs multiplex para identificar os 30 sorotipos mais comuns de *Salmonella enterica* subsp.

enterica de relevância clínica, e obtiveram resultados compatíveis com a sorotipagem convencional. Outros estudos baseados em técnicas de PCR multiplex podem ser encontrados na literatura para diferenciação de sorotipos de *Salmonella* spp., com resultados satisfatórios (Akiba et al., 2011; Alvarez et al., 2004; Cardona-Castro et al., 2009; Freitas et al., 2010; Herrera-Leon et al., 2007; Liu et al., 2012; O'Regan et al., 2008). No entanto, a técnica de PCR não é capaz de distinguir entre células viáveis e não viáveis, daí a importância de ser combinada com testes microbiológicos convencionais (Freitas et al., 2010).

Apesar de útil, a sorotipagem molecular apresenta outras limitações, como exemplo o número de sorotipos que podem ser abordados em uma reação, uma vez que nem sempre é possível a padronização de uma reação usando vários pares de primers (Barco et al., 2013). Por isso, o ideal é seu uso em conjunto com outras técnicas, como por exemplo o PFGE, a fim de promover ainda mais a discriminação dos isolados (Kim et al., 2015).

PFGE é considerado a técnica de referência para a subtipagem de bactérias de origem alimentar e é a técnica mais frequentemente utilizada para investigações epidemiológicas de toxinfecções alimentares, apesar de não ser a mais atual (Goering, 2010; Ribot et al., 2006). A técnica de PFGE baseia-se na utilização de enzimas de restrição (endonucleases) para fragmentar o DNA bacteriano em determinados locais conhecidos como locais de restrição. Estas enzimas de restrição são selecionadas para gerar pedaços de DNA que podem ser separados com base nos seus pesos moleculares, através de um campo elétrico que tem sua orientação alternada ciclicamente (Goering, 2010; Liebana, 2002). O potencial “significativo” por trás do método de PFGE é a comparação de dois ou mais isolados bacterianos para se obter um sentido de parentesco genômico, geralmente num contexto epidemiológico (Goering, 2010). Aliás, o contexto

epidemiológico é considerado essencial na análise dos resultados de PFGE (Vongkamjan & Wiedmann, 2014).

Apesar de ser considerada a técnica de referência para investigações epidemiológicas, o PFGE é conhecido por ser um procedimento trabalhoso, demorado, com limitações quanto à falta de padronização entre laboratórios, dificultando a comparação dos resultados, e também alterações na taxa de migração eletroforética em decorrência de mudanças no tamanho molecular dos fragmentos devido inserções, deleções, mutações e rearranjos (Barco et al., 2013; Goering, 2010; Kim et al., 2015; Ribot et al., 2006). Diversos estudos utilizam o PFGE para identificação das principais fontes de contaminação por *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de aves, bovinos e suínos, com resultados bastante consistentes (Arguello et al., 2013; Chen et al., 2011; Cossi et al., 2014; Kim et al., 2007; Laconcha et al., 2000; Lee et al., 2007; Mannion et al., 2012; Nogrady et al., 2008; Piras et al., 2011).

Em síntese, essas ferramentas de caracterização molecular podem ser frequentemente usadas para permitir o rastreamento epidemiológico de cepas envolvidas em surtos e casos de toxinfecções alimentares; uma vez identificado um caso ou surto, os agentes patogênicos podem ser isolados de amostras clínicas e de alimentos consumidos, e seus perfis genéticos caracterizados para determinação de uma possível associação e definição das causas dos agravos identificados, além também de poder ser usada em toda a cadeia de produção a fim de se identificar a fonte inicial de contaminação e assim adotar medidas de controles efetivas desde o início da cadeia evitando a contaminação do produto final.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABIEC, 2015. Estatística/Balanço da Pecuária, Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-interno.html>, 30/04/2015

- ABPA, 2014. A avicultura brasileira, Disponível em: [http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/sistema\\_de\\_integracao](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/sistema_de_integracao), 03/12/2014
- ABPA, 2015. Mercado interno de carne suína, Disponível em: <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>, 30/04/2015
- Akiba, M., Kusumoto, M., & Iwata, T., 2011. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85:9-15.
- Alvarez-Fernandez, E., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, C., & Capita, R., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* 153:281-287.
- Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., & Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1734-1738.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., & Pestana, N., 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82:97-103.
- Arguello, H., Carvajal, A., Naharro, G., Arcos, M., Rodicio, M.R., Martin, M.C., & Rubio, P., 2013. Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology* 161:44-52.
- Barco, L., Barrucci, F., Olsen, J.E., & Ricci, A., 2013. *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping. *International Journal of Food Microbiology* 163:193-203.
- Belusso, D. & Hespanhol, A.N., 2010. A Evolução da Avicultura Industrial Brasileira e seus Efeitos Territoriais. *Revista Percurso* 2:25-51.
- Borsoi, A., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., & Nascimento, V.P., 2010. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural* 40:2338-2342.
- Brasil, 1997. Portaria 368-Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração pra estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos, p. 12p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 1998. Portaria 46-Manual Genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal, p. 32p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 1998. Portaria 210-Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves, p. 34p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2001a. Resolução 12-Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, p. 48p. In: Sanitária-ANVISA, A.N.d.V. (ed.), Brasília, DF, Brasil.

- Brasil, 2001b. Resolução 13- Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, p. 4p. In: Sanitária-ANVISA, A.N.d.V. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2003a. Instrução Normativa 70-Programa de Redução de Patógenos-Monitoramento Microbiológico e controle de Salmonella sp. em carcaças de frangos e perus, p. 6p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2003b. Resolução 10-Programa de procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO) nos estabelecimentos de leite e derivados, p. 4p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2005. Circular Nº 175/2005/CGPE/DIPOA - Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. In: MAPA (ed.), 175. MAPA, Brasília.
- Brasil, 2008. Nota técnica-Divulgação dos resultados do banco de dados gerado a partir da implantação da Instrução Normativa 70, de 6 de outubro de 2003, p. 8p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2013a. Projeções do Agronegócio : Brasil 2012/2013 a 2022/2023-Projeções de Longo Prazo, p. 96. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2013b. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos, p. 23p. In: Saúde-MS, M.d. (ed.). Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2014. Aves, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>, 02/12/2014
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A., & Nisbet, D.J., 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella. *Journal of Animal Science* 86:163-172.
- Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & del Camino Garcia-Fernandez, M., 2003. Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 81:169-173.
- Cardona-Castro, N., Sanchez-Jimenez, M., Lavalett, L., Munoz, N., & Moreno, J., 2009. Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify Salmonella serogroups and serotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 65:327-330.
- CDC, 2014. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States, Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>, 03/12/2014
- Chen, M.H., Hwang, W.Z., Wang, S.W., Shih, Y.C., & Tsen, H.Y., 2011. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant Salmonella enterica serovar Schwarzengrund isolates collected in six years (2000-2005) from retail chicken meat in Taiwan. *Food Microbiology* 28:399-405.
- Corry, J.E., Allen, V.M., Hudson, W.R., Breslin, M.F., & Davies, R.H., 2002. Sources of Salmonella on broiler carcasses during

- transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology* 92:424-432.
- Cortez, A.L., Carvalho, A.C., Ikuno, A.A., Burger, K.P., & Vidal-Martins, A.M., 2006a. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in Veterinary Science* 81:340-344.
- Cortez, A.L., Carvalho, A.C., Ikuno, A.A., Burger, K.P., & Vidal-Martins, A.M., 2006b. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arquivos do Instituto Biológico* 73:157-163.
- Cossi, M.V.C., Burin, R.C.K., Camargo, A.C., Dias, M.R., Lanna, F.G.P.A., Pinto, P.S.A., & Nero, L.A., 2014. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. *Food Control* 40:320-323.
- Domínguez, C., Gómez, I., & Zumalacárregui, J., 2002. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 72:165-168.
- Donnenberg, M.S. & Narayanan, S., 2013. How to diagnose a foodborne illness. *Infectious Disease Clinics* 27:535-554.
- Duarte, D.A.M., Ribeiro, A.R., Vasconcelos, A.M.M., Santos, S.B., Silva, J.V.D., Andrade, P.L.A., & Falcão, L.S.P.C., 2009. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:569-573.
- FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO/WHO, 2011. Guidelines for the control of *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken meat., p. 26p. In: *Alimentarius, C.* (ed.).
- Fernandes Filho, J.F. & Queiroz, A.M., 2002. Transformações recentes na avicultura de corte brasileira: o caso do modelo de integração, p. 13p, XL Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, Passo Fundo, RS, Brasil.
- Freitas, C.G., Santana, A.P., Silva, P.H., Goncalves, V.S., M.A., B., Torres, F.A., Murata, L.S., & Perecmanis, S., 2010. PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology* 139:15-22.
- Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., & Daube, G., 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection* 71:35-45.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10:866-875.

- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., & Weill, F.X., 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161:26-29.
- Havelaar, A.H., Haagsma, J.A., Mangen, M.J., Kemmeren, J.M., Verhoef, L.P.B., Vijgen, S.M.C., Wilson, M., Friesema, I.H.M., Kortbeek, L.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., & van Pelt, W., 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International Journal of Food Microbiology* 156:231-238.
- Herrera-Leon, S., Ramiro, R., Arroyo, M., Diez, R., Usera, M.A., & Echeita, M.A., 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Research in Microbiology* 158:122-127.
- Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K., & De Zutter, L., 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection* 129:253-265.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Lalande, F., Allain, V., Rouxel, S., Petetin, I., Quesne, S., Laisney, M., Gloaguen, P., Picherot, M., Salvat, G., Bougeard, S., & Chemaly, M., 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. *Food Control* 22:1158-1164.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., & Golden, D.A., 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer, New York, USA.
- Kim, A., Lee, Y.J., Kang, M.S., Kwag, S.I., & Cho, J.K., 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* 8:155-161.
- Kim, Y.S., Lee, S.H., Kim, S.H., Joo, Y., & Bahk, G.J., 2015. Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea. *Food Control* 47:226-230.
- Kirk, M., Ford, L., Glass, K., & Hall, G., 2014. Foodborne illness, Australia, circa 2000 and circa 2010. *Emerging Infectious Diseases* 20:1857-1864.
- Laconcha, I., Baggesen, D.L., Rementeria, A., & Garaizar, J., 2000. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Veterinary Microbiology* 75:155-165.
- Lazzari, M.R., 2004. Avicultura de corte no Brasil: uma comparação entre as Regiões Sul e Centro-Oeste. *Indicadores Econômicos FEE* 31:259-290.
- Lee, Y.J., Kim, H.J., Park, C.K., Kim, K.S., Bae, D.H., Kang, M.S., Cho, J.K., Kim, A.R., Kim, J.W., & Kim, B.H., 2007. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from an integrated broiler chicken operation in Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69:399-404.
- Liebana, E., 2002. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. *Research in Veterinary Science* 72:169-175.

- Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., He, X., & Shi, X., 2011. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology* 144:511-518.
- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., & Shi, X., 2012. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* 27:87-93.
- Lopes, M., Galhardo, J.A., Oliveira, J.T., Tamanini, R., Sanches, S.F., & Muller, E.E., 2007. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina: Ciências Agrárias* 28:465-476.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., & Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50:882-889.
- Mannion, C., Fanning, J., McLernon, J., Lendrum, L., Gutierrez, M., Duggan, S., & Egan, J., 2012. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. *Food Research International* 45:871-879.
- Milios, K.T., Drosinos, E.H., & Zoiopoulos, P.E., 2014. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria – a review. *Food Control* 43:74-81.
- Moreira, G.N., Rezende, C.S.M., Carvalho, R.N., Mesquita, S.Q.P., Oliveira, A.N., & Arruda, M.L.T., 2008. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* 67:126-130.
- Nogrady, N., Kardos, G., Bistyak, A., Turcsanyi, I., Meszaros, J., Galantai, Z., Juhasz, A., Samu, P., Kaszanyitzky, J.E., Paszti, J., & Kiss, I., 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* *Infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 127:162-167.
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G., Whyte, P., & Fanning, S., 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology* 8:156.
- Olsen, J.E., Brown, D.J., Madsen, M., & Bisgaard, M., 2003. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of Applied Microbiology* 94:826-835.
- Park, S.H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Bouldin, J.L., Ahn, S., & Ricke, S.C., 2014. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology* 38:250-262.

- Piras, F., Brown, D.J., Meloni, D., Mureddu, A., & Mazzette, R., 2011. Investigation of *Salmonella enterica* in Sardinian slaughter pigs: prevalence, serotype and genotype characterization. *International Journal of Food Microbiology* 151:201-209.
- Rasschaert, G., Houf, K., & De Zutter, L., 2007. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology* 103:333-341.
- Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R., Bessa, M.C., & Nascimento, V.P., 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:296-299.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., & Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:59-67.
- Richetti, A., Melo Filho, G.A., & Fernandes, F.M., 2002. *Sistema integrado de produção de frango de corte em área de assentamento de reforma agrária*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, Dourados, MS, Brasil.
- Rodrigues, A.C.A., Pinto, P.S.A., Vanetti, M.C.D., Bevilacqua, P.D., Pinto, M.S., & Nero, L.A., 2008. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. *Ciência Rural* 38:1948-1953.
- Rodrigues, W.O.P., Garcia, R.G., Nääs, I.A., Rosa, C.O., & Caldarelli, C.E., 2014. Evolução da avicultura de corte no Brasil. *Enciclopédia Biosfera* 10:1666-1684.
- Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A., & Gómez-Duarte, O.G., 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease* 9:263-277.
- Santos, D.M.S., Berchieri Jr., A., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., & Amaral, L.A., 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20:39-42.
- Silva, E.N. & Duarte, A., 2002. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 4:85-100.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., & Gomes, R.A.R., 2007. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela, São Paulo.
- Steve Yan, S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P., & Foley, S.L., 2003. An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4:189-204.
- Tessari, E.N.C., Cardoso, A.L.S.P., Kanashiro, A.M.I., Stoppa, G.F.Z., Luciano, R.L., & Castro, A.G.M., 2008. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*.

- Tirolli, I.C.C. & Costa, C.A., 2006. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazonica* 36:205-208.
- UBABEF, 2014. Relatório Anual 2014, p. 55p. In: *Avicultura*, U.B.d. (ed.), São Paulo, SP, Brasil.
- USDA, 2014. Foodborne illness: what consumers need to know, Disponível em: [http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/ct\\_index](http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/ct_index), 08/12/2014
- Von Rückert, D.A., Pinto, P.S., Santos, B.M., Moreira, M.A., & Rodrigues, A.C., 2009. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61:326-330.
- Vongkamjan, K. & Wiedmann, M., 2014. Starting from the bench-Prevention and control of foodborne and zoonotic diseases. *Preventive Veterinary Medicine* 118:189-195.
- Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X., & Zhou, G., 2013. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control* 33:378-384.
- WHO, 2014. *Salmonella*, Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>, 08/12/2014
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S., & Ertas, N., 2011. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International* 44:725-728.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Esse estudo teve como objetivo geral caracterizar a contaminação por micro-organismos indicadores de higiene e realizar um rastreamento a nível molecular da contaminação de *Salmonella* spp. na linha de abate e processamento de frangos de corte de dois matadouros de aves localizados no estado de Minas Gerais.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a qualidade microbiológica das carcaças de frango e do ambiente de abate em diferentes pontos das linhas de processamento de dois estabelecimentos industriais, através da pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e da pesquisa de *Salmonella* spp.
- Verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em duas linhas de abate de frangos, identificando os principais pontos de contaminação por esse patógeno.
- Determinar os perfis genéticos por PFGE e avaliar a diversidade genética entre os isolados de *Salmonella* spp.
- Realizar rastreamento molecular de *Salmonella* spp. nas linhas de abate e processamento, visando identificar por PFGE as origens de contaminação das diferentes cepas obtidas das amostras.

**CAPÍTULO 1. Contaminação microbiológica ao longo da linha de abate e  
processamento de frangos em Minas Gerais, Brasil.**

Mariane Rezende Dias et al.

## RESUMO

Esse estudo teve como objetivo caracterizar as variações dos níveis de contaminação por indicadores de higiene em pontos chave da linha de abate e processamento de frangos. Amostras de caixas de transporte de aves, carcaças (após depenagem - C1, após evisceração - C2, e após pré-resfriamento - C3), cortes finais e equipamentos e ambiente de processamento (facas, esteiras de cortes, mãos de manipuladores) foram coletadas de dois matadouros de aves (Mt1-grande porte e Mt2-pequeno porte) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, e submetidas à enumeração de micro-organismos indicadores de higiene: aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli*. A variação da contaminação microbiológica ao longo da linha de abate e processamento foi similar em Mt1 e Mt2. Na recepção, as médias das contagens por todos os indicadores de higiene pesquisados foram estatisticamente similares ( $p > 0,05$ ). Durante o abate, em ambos os matadouros não foram observadas diferenças significativas entre as contagens obtidas em C1 e C2 ( $p > 0,05$ ), porém redução significativa em C3 ( $p < 0,05$ ); C1 e C2 apresentaram contagens superiores e C3 contagens inferiores em Mt1 quando comparado a Mt2 ( $p < 0,05$ ). Amostras de cortes, equipamentos e utensílios apresentaram contagens inferiores em Mt1 ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos demonstram que apesar de Mt1 apresentar maiores níveis de contaminação nas etapas iniciais do abate, foi possível a obtenção de menores índices de contaminação nas etapas finais do abate e nos produtos finais, indicando eficiência dos processos de higienização adotados. Assim, foi possível identificar a variação da contaminação microbiológica ao longo do abate e processamento de frangos nos dois matadouros incluídos do estudo, o que auxilia a determinação de medidas efetivas de descontaminação e higienização nessa cadeia produtiva.

Palavras-chave: carne de frango, indicadores de higiene, linha de abate e processamento

## ABSTRACT

This study aimed to characterize the variations of contamination levels based on hygiene indicators in key steps during slaughtering and processing of poultry. Samples from transport boxes of chickens, carcasses (after plucking - C1, after evisceration - C2, after pre-cooling - C3), final cuts, equipment, and the processing environment (knives, cutting mats hands of employees) were collected from two poultry slaughter houses (Mt1-large size and Mt2-small size) located in Minas Gerais state, Brazil, and were subjected to the enumeration of hygiene indicator microorganisms: mesophiles, enterobacteria, coliforms, and *Escherichia coli*. The variation in microbiological contamination throughout the slaughtering and processing of poultry was similar for Mt1 and Mt2. In the reception, the averages from counting all hygiene indicators were statistically similar ( $P > 0.05$ ). During the slaughtering, both slaughterhouses did not show significant differences between the counts that were obtained for C1 and C2 ( $P > 0.05$ ), although there was a significant reduction for C3 ( $P < 0.05$ ); C1 and C2 presented with greater counts and C3 with lower counts for Mt1 when compared to Mt2 ( $P < 0.05$ ). Samples from cuts, equipment, and utensils presented with lower counts for Mt1 ( $P < 0.05$ ). The results showed that despite Mt1 presenting with greater contamination levels in the initial slaughter steps, it was possible to obtain lower contamination levels in the final slaughter steps and final products, thus indicating efficiency of the hygiene processes that were adopted. Thus, it was possible to identify the variation in microbiological contamination throughout the slaughter and processing of chickens in the two slaughter houses that were included in the study, which helps to determine effective measures of decontamination and hygiene in this production chain.

Key words: chicken meat, hygiene indicators, slaughter and processing

## INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira apresentou expressivo crescimento nas últimas décadas, posicionando o país como o terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango em todo o mundo (Brasil, 2014; UBABEF, 2014). Para garantir essa posição de destaque, tem sido fundamental que a produção de aves atenda a rigorosos critérios de qualidade e inocuidade, uma vez que contaminações microbiológicas podem determinar perdas econômicas diretas devido à deterioração e enfermidades associadas a esses produtos, além das perdas indiretas devido aos entraves na exportação dos alimentos (Tsola et al., 2008). Esse cenário determina que a presença de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em carne de aves e seus subprodutos é uma preocupação constante para fornecedores, consumidores e autoridades de saúde pública em todo o mundo (Álvarez-Astorga et al., 2002).

Nesse contexto, a pesquisa de indicadores bacterianos se destaca como uma forma de avaliar os níveis de higiene durante o processo de abate, e também da qualidade microbiológica do produto final (Ghafir et al., 2008; Lopes et al., 2007). Como exemplo, os micro-organismos aeróbios mesófilos podem ser utilizados como indicadores das condições higiênicas gerais durante todo o processo de produção, enquanto enterobactérias, coliformes e *Escherichia coli* podem ser usadas como indicadores de contaminação entérica (Ghafir et al., 2008; Milios et al., 2014). A presença desses micro-organismos em carnes em altas quantidades pode indicar deficiências na limpeza e higiene durante o processo de produção (Vaidya et al., 2005).

No Brasil, o único parâmetro relacionado a micro-organismos indicadores de higiene existente para carne de aves é encontrado na RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na qual é determinado que carnes de aves "in natura" (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) resfriadas ou

congeladas, devem apresentar os seguintes parâmetros para Coliformes a 45°/g: n = 5, c = 3, m = 5x10<sup>3</sup> UFC/g, M = 10<sup>4</sup> UFC/g (Brasil, 2001). Esse único parâmetro microbiológico não permite um monitoramento totalmente adequado da qualidade e segurança de carnes de aves, o que demanda das indústrias processadoras a utilização de parâmetros alternativos para realização desse controle. Assim, usualmente essas indústrias utilizam parâmetros internacionais de qualidade e segurança, muitas vezes obtidos dos países importadores de seus produtos.

Nesse contexto, estudos que forneçam o perfil microbiológico geral em pontos específicos da cadeia produtiva são fundamentais para o desenvolvimento de critérios microbiológicos que possam ser utilizados em programas de monitoramento implantados pelas indústrias, servindo assim como base para as medidas de controle adotadas (Lindblad et al., 2006). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a contaminação microbiológica por micro-organismos indicadores de higiene ao longo da linha de abate e processamento de frangos, desde a recepção das aves até o processamento de cortes finais em estabelecimentos localizados em Minas Gerais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Matadouros e amostragem**

Dois matadouros de aves localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, foram selecionados no presente estudo depois da concordância dos respectivos proprietários e da identificação de que o abate realizado nesses estabelecimentos era regularmente fiscalizado por Serviços Oficiais de Inspeção, conforme características descritas a seguir:

- ✓ Matadouro 1 (Mt1): estabelecimento de grande porte, abate médio de 180.000 frangos por dia, possui linha de evisceração automática, programas de autocontrole devidamente implantados, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), habilitado à exportação, utiliza o sistema de integração, e produz uma grande variedade de produtos.
- ✓ Matadouro 2 (Mt2): estabelecimento de pequeno porte, abate médio de 3.500 a 4.000 frangos por dia, linha de evisceração manual, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Municipal, e produz principalmente frangos inteiros.

Cada matadouro foi visitado cinco vezes por um período de nove meses, onde amostras de utensílios, equipamentos, carcaças e produtos finais foram coletadas ao longo da cadeia produtiva dos lotes de aves processados, nas etapas de recepção, abate e processamento (Tabela 1).

A coleta de amostras das carcaças e dos cortes (coxa, peito e asa) foi realizada pelo método de enxágue recomendado pelo USDA/FSIS (2014). As amostras foram obtidas nas diferentes etapas, transferidas para bolsas estéreis e pesadas. Em seguida, 400 mL de Tampão Fosfato pH 7,2 foram adicionados a cada bolsa e homogeneizados. Os homogenatos resultantes foram transferidos para bolsas estéreis, e mantidos sob refrigeração até o início das análises.

A coleta de amostras de superfícies (caixas de transporte, esteiras de cortes, mãos de funcionários e facas) foi realizada por swab com auxílio de esponjas estéreis pré-umedecidas com 40 mL de Tampão Fosfato pH 7,2, em quatro regiões de 100 cm<sup>2</sup> da mesma superfície, sendo as amostras de esteiras de cortes, mãos e facas coletadas na sala de cortes de cada matadouro. Em seguida, as 4 esponjas utilizadas por amostra eram acondicionadas em uma bolsa estéril com 160 mL de Tampão Fosfato pH 7,2,

completando um volume final de 200 mL, correspondente a 400 cm<sup>2</sup> amostrados. Os conjuntos eram mantidos sob refrigeração até o início das análises.

### **Enumeração de micro-organismos indicadores de higiene**

Todas as amostras coletadas foram inicialmente submetidas à homogeneização peristáltica em “Stomacher” (Stomacher 400 circulator, Seward, Worthing, England), e submetidas à diluição seriada em escala decimal, utilizando-se NaCl 0,85% (m/v). Duas diluições de cada amostra foram selecionadas, considerando o seu provável nível de contaminação microbiológica, e semeadas em Petrifilm™ Aerobic Count (3M Microbiology, St Paul, MN, EUA) para a enumeração de aeróbios mesófilos (AM), Petrifilm™ Enterobacteriaceae (3M) para enumeração de enterobactérias (EB), e Petrifilm™ Escherichia coli (3M) para enumeração de coliformes totais (CT) e E. coli (EC). Todas as placas foram incubadas a 35 °C, por 24 a 48 h, quando as colônias formadas foram enumeradas considerando as características fenotípicas de cada grupo: AM: colônias vermelhas formadas após 24 h; EB: colônias amarelas associadas ou não a gás, e colônias associadas a gás, formadas após 24 h; CT: colônias vermelhas e azuis associadas a gás, formadas após 24 h; EC: colônias azuis associadas a gás, formadas após 48 h. Todos os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou por cm<sup>2</sup>, de acordo com a característica de cada amostra.

### **Monitoramento do Cloro residual e Temperatura**

As medidas de temperatura (°C) e cloro residual (ppm) do último tanque de pré-resfriamento, após a obtenção das amostras de carcaças de frangos em C3 (Tabela

1), foram obtidas pelas equipes de controle de qualidade dos matadouros incluídos no estudo. Para mensuração da temperatura, foram utilizados termômetros de mercúrio ou digitais com leitor infra-vermelho. A quantidade de cloro residual foi aferida utilizando-se kits específicos de cada estabelecimento.

### **Análises dos dados**

As contagens de AM, EB, CT e EC foram convertidas em  $\log_{10}$ , avaliadas quanto à distribuição normal e homogeneidade, e submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e Tukey para identificação de diferenças significativas entre as amostras obtidas dos diferentes matadouros e etapas da cadeia produtiva ( $p < 0,05$ ).

Adicionalmente, para cada grupo microbiano e etapa do abate (C1, C2, C3) foi calculado um valor referencial que correspondia à média somada ao desvio padrão; em seguida, as frequências de amostras que apresentaram contagens acima desses valores foram comparadas pelo teste de Chi-quadrado ( $p < 0,05$ ). Essa análise foi realizada considerando critérios usualmente adotados para implantação de Programas de Auto-Controle em matadouros, especificamente em relação ao monitoramento da contaminação microbiológica em carcaças ao final do abate (Brasil, 2005).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se os softwares Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e XLSat 2010.2.03 (AddinSoft, New York, NY, EUA).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As médias das contagens de cada indicador bacteriano analisado nas caixas de transporte de frango das granjas até os matadouros avaliados são apresentadas na Tabela 2. Observa-se que não houve diferença de contaminação entre Mt1 e Mt2 ( $p > 0,05$ )

para nenhum dos indicadores avaliados. Os resultados encontrados demonstram que a contaminação intrínseca do animal é importante na introdução de micro-organismos nos matadouros, sendo a etapa de transporte fundamental na disseminação dessa contaminação, uma vez que é uma atividade que envolve grande estresse, sendo as aves muitas vezes confinadas e aglomeradas em caixas por longas distâncias em condições sanitárias inadequadas (Nogrady et al., 2008; Tirolli & Costa, 2006). Assim, a correta limpeza e desinfecção das caixas de transporte dos frangos são atividades fundamentais para redução da contaminação, além de práticas adequadas de manejo dos animais para minimizar as situações de estresse durante o transporte.

A Tabela 3 apresenta as médias de contagens para os indicadores bacterianos analisados nas três etapas do abate (C1-após depenagem, C2-após evisceração, C3- após pré-resfriamento) nos dois estabelecimentos estudados. Observa-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) de contaminação entre as carcaças coletadas nas duas primeiras etapas avaliadas para nenhum dos indicadores estudados. No entanto, ao se comparar os dois matadouros constata-se que as médias de contaminação encontradas nas duas primeiras etapas no Mt1 são significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aquelas encontradas no Mt2, sendo que os valores encontrados em ambos estabelecimentos podem ser considerados altos. Como já relatado por Rodrigues et al. (2008), a automatização da linha de abate, especialmente da evisceração, associada à provável falta de padronização dos tamanhos dos animais de um mesmo lote, pode determinar problemas como o rompimento das vísceras e conseqüente maior contaminação microbiológica. Essa característica pode explicar as diferenças observadas entre Mt1 e Mt2 nas contagens obtidas em C1 e C2 (Tabela 2): Mt1 é um matadouro de grande porte com sistema automático de evisceração, com uma capacidade elevada de produção, o que pode dificultar ainda mais o controle devido à alta velocidade da linha de abate. Resultados semelhantes foram descritos em outros

estudos, demonstrando a importância das etapas de depenagem e evisceração para a contaminação microbiana ao longo da cadeia produtiva de carne de aves (Abu-Ruwaida et al., 1994; Goksoy et al., 2004; Matias et al., 2010; Rodrigues et al., 2008; Vaidya et al., 2005; Yashoda et al., 2001; Zweifel et al., 2015). Porém, resultados diferentes foram observados no estudo feito por Matias et al. (2010), que observaram altas contagens de AM e EC em carcaças obtidas durante o abate em um matadouro de pequeno porte, e associaram esses resultados à manipulação exagerada e inadequada durante a evisceração manual, ou ferramentas e utensílios inadequados ou mal higienizados. Essa mesma interpretação foi sugerida por Tsola et al. (2008), que encontraram uma redução da contaminação ao longo da linha de abate após sua automatização.

Ainda na Tabela 3 pode ser observado que houve uma redução significativa dos níveis de contaminação de todos os indicadores de higiene entre as etapas C1-C2 e C3 (após pré-resfriamento, chiller final) em ambos os matadouros ( $p < 0,05$ ). Esses resultados demonstram a importância do pré-resfriamento como um ponto crítico de controle, uma vez que após essa etapa as carcaças serão embaladas ou destinadas a processamento, não havendo nenhum outro procedimento para redução da contaminação existente. Ainda, ao comparar os dois matadouros verifica-se que a redução ocorrida em Mt1 foi significativamente maior que aquela ocorrida no Mt2 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Embora Mt1 tenha apresentado maiores médias nas contagens dos indicadores de higiene nas etapas iniciais do abate, esse matadouro conseguiu produzir carcaças com menores níveis de contaminação microbiológica do que Mt2, o que implica em produtos com melhor qualidade microbiológica, e consequentemente maior vida de prateleira. Resultados semelhantes de redução do nível de contaminação das carcaças após o pré-resfriamento foi observada por outros autores, demonstrando a importância dessa etapa na garantia de um produto de qualidade microbiológica

satisfatória (Allen et al., 2000; Jimenez et al., 2003; Matias et al., 2010; Rodrigues et al., 2008; Smith et al., 2005).

Além das diferenças entre Mt1 e Mt2 em relação ao número de aves abatidas e equipamentos utilizados nas etapas de abate, o controle de temperatura da água do chiller e a quantidade de cloro residual podem ter contribuído para as diferenças observadas nas contagens dos indicadores de higiene (Tabela 4). A legislação brasileira exige que a temperatura na saída do chiller final seja inferior ou igual a 4°C, e que a sua água pode ser hiperclorada, com um nível máximo de 5 ppm de cloro residual, não estabelecendo, entretanto, nível mínimo (Brasil, 1998). A média da temperatura no chiller do Mt1 encontrou-se dentro do parâmetro exigido pela legislação (0,925 °C), ao contrário do que foi observado em Mt2 (temperatura média de 8,0 °C). Uma diferença similar foi observada entre Mt1 e Mt2 em relação a concentração de cloro residual na água do chiller: Mt1 apresentou média de 3,085 ppm, enquanto Mt2 apresentou média de 1,625 ppm. Além disso, os valores de cloro residual encontrados em Mt2 apresentaram uma grande variação (dados não mostrados), o que indica que a etapa de pré-resfriamento nesse matadouro não é rigorosamente controlada como em Mt1, o que favorece a obtenção de produtos finais com baixa qualidade microbiológica. Estudo com resultados semelhantes foi realizado por Matias et al. (2010), que ao comparar os níveis de contaminação entre matadouros de pequeno e médio portes, encontraram que o matadouro de menor porte apresentou médias de contaminação microbiológica após pré-resfriamento superiores àquelas encontradas no de grande porte, e ao comparar com os resultados de temperatura, observou-se que o matadouro de pequeno porte apresentou valores com alta variação, fora dos limites estabelecidos pela legislação.

Diferente dos resultados obtidos, outros estudos não observaram redução significativa de micro-organismos indicadores em carcaças de aves após a etapa de pré-resfriamento (Abu-Ruwaida et al., 1994; Goksoy et al., 2004; Hutchison et al., 2006;

Lopes et al., 2007; Vaidya et al., 2005; Zweifel et al., 2015). Entretanto, a etapa de pré-resfriamento nesses estudos é realizada pela aplicação de ar frio, e não por imersão em tanques com água gelada, sugerindo diferenças de desempenho desses processos na redução da contaminação microbiológica de carcaças de aves.

As médias de contagens obtidas em amostras dos ambientes de processamento são apresentados na Tabela 5. As médias de contaminação por AM foram significativamente diferentes entre os dois matadouros ( $p < 0,05$ ), sendo que as médias observadas em Mt2 foram maiores que em Mt1. Para EB e CT, as médias de contaminação verificadas nas esteiras de cortes não apresentaram diferenças significativas entre Mt1 e Mt2 ( $p > 0,05$ ); no entanto, as médias encontradas para as mãos e facas foram significativamente maiores em Mt2 do que em Mt1 ( $p < 0,05$ ). Já para EC, as médias encontradas nas facas não apresentaram diferença significativa entre Mt1 e Mt2 ( $p > 0,05$ ); no entanto, as médias encontradas para as esteiras de cortes e mãos foram significativamente maiores em Mt2 que em Mt1. Abu-Ruwaida et al. (1994) analisaram equipamentos e utensílios nas áreas de evisceração e embalagem e encontraram médias de contaminação por aeróbios variando entre 4,0 e 7,7 log UFC/cm<sup>2</sup>, sendo as médias encontradas na área de evisceração maiores que as observadas na área de embalagens, e concluíram que os equipamentos e utensílios eram insalubres e influenciaram diretamente na contaminação microbiológica das carcaças, com prejuízo para a sua qualidade. Os resultados obtidos permitem identificar deficiências higiênicas no matadouro de pequeno porte (Mt2), determinando a necessidade de adoção de medidas para melhoria dos procedimentos de higiene e desinfecção, para reduzir a contaminação das carcaças e produtos cárneos durante suas etapas de processamento, e garantindo a obtenção de produtos finais com melhor qualidade. Recontaminação de produtos através de superfícies contaminadas tem sido observada em muitos casos, e é uma questão importante que usualmente ocorre como

consequência de limpeza e desinfecção ineficazes ou insuficientes (Reij & Den Aantrekker, 2004).

Na Tabela 6 são apresentadas as médias de contagens dos indicadores de higiene pesquisados nos cortes finais obtidos em Mt1 e Mt2. As médias de contaminação para os três tipos de cortes amostrados foram significativamente maiores em Mt2 do que em Mt1 ( $p < 0,05$ ). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos em carcaças após pré-resfriamento (C3, Tabela 3) e ambiente de processamento de cortes (Tabela 4), onde Mt2 apresentou contagens de indicadores de higiene significativamente superiores quando comparadas a Mt1 ( $p < 0,05$ ). Álvarez-Astorga et al. (2002) encontraram altas contagens de indicadores de mesófilos, coliformes e E. coli em coxas e asas de aves em estudo realizado em León, Espanha, e concluíram que esses resultados eram indicativos de baixa qualidade microbiológica desses produtos; esses resultados são semelhantes aos observados nos mesmos cortes finais de aves obtidos em Mt2, e confirmam que as deficiências higiênicas observadas em etapas de abate e no ambiente de processamento de produtos cárneos comprometem a qualidade microbiológica dos produtos finais.

Considerando os critérios usualmente adotados para implantação de Programas de Auto Controle em matadouros, especificamente os relacionados aos critérios microbiológicos, nos quais o limite superior é estabelecido através da soma da média com o desvio padrão, sendo a média obtida através de uma série histórica de resultados, (Brasil, 2005), a Tabela 7 apresenta as frequências de amostras de carcaças de frango que apresentaram contagens acima de valores referenciais (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos por cada etapa e matadouro. Embora não sejam observadas diferenças significativas entre as frequências de amostras com contagens acima dos valores referenciais em cada etapa e matadouro ( $p > 0,05$ ), observa-se em Mt1 uma redução dessa frequência entre as etapas C1-C2 e C3, e um padrão não uniforme em Mt2:

frequências similares para AM, redução e aumento de frequências para EB e EC, respectivamente, e redução de frequências apenas para CT (Tabela 7). Esses resultados são coerentes com os observados na Tabela 3, comprovando que as primeiras etapas de abate em Mt1 são as que promovem a maior contaminação das carcaças, sendo provavelmente devido ao grande volume e velocidade de abate. Apesar do pré-resfriamento nesse estabelecimento exercer um efetivo controle do final do processo de abate, há necessidade de melhorias nas etapas iniciais, já que a alta contaminação pode favorecer a disseminação e persistência de micro-organismos indicadores e patógenos. Apesar do menor nível de contaminação nas primeiras etapas do abate em Mt2 (Tabela 3), decorrente provavelmente de um maior controle devido ao menor volume e capacidade de abate, o controle deficiente na etapa de pré-resfriamento (Tabela 7) determina que o produto final obtido seja de baixa qualidade microbiológica (Tabelas 3 e 6), evidenciando a necessidade de maior controle nessa etapa do abate. Conclusões semelhantes foram descritas por Matias et al. (2010), ao comparar os resultados de dois matadouros (pequeno e grande porte) e destacando que apesar do matadouro de menor porte não ter um sistema de autocontrole efetivo, sua baixa capacidade de abate pode contribuir para o controle do processo de produção, enquanto o de maior porte, apesar de possuir programas de monitoramento consolidados, possui um grande volume de abate que pode interferir na performance dos procedimentos de controle de qualidade.

## **CONCLUSÃO**

Nesse estudo, foi possível identificar que as etapas iniciais de abate favoreceram a contaminação das carcaças de frango, sendo essa contaminação mais expressiva no matadouro de grande porte, provavelmente associada à alta velocidade e automatização do abate. Ainda, foi possível observar que a etapa de pré-resfriamento foi

fundamental na redução dessa contaminação em ambos matadouros, no entanto, quanto maior o controle da temperatura e cloração nessa etapa, maior foi a redução da contaminação das carcaças, e melhor qualidade microbiológica do produto final. Com isso, foi possível identificar os principais pontos de contaminação e também de controle nas diferentes etapas de abate dos matadouros estudados, podendo ser usados como base para adoção de medidas corretivas, a fim de melhorar o processo produtivo, e conseqüentemente, fornecer alimentos com alta qualidade microbiológica aos consumidores.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abu-Ruwaida, A.S., Sawaya, W.N., Dashti, B.H., Murad, M., & Al-Othman, H.A., 1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection* 57:887-892.
- Allen, V.M., Corry, J.E.L., Burton, C.H., Whyte, R.T., & Mead, G.C., 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology* 58:39-48.
- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernández, M.C., 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* 62:45-50.
- Brasil, 1998. Portaria 210-Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves, p. 34p. In: Ministério da Agricultura, P.e.A.-M. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2001. Resolução 12-Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, p. 48p. In: Sanitária-ANVISA, A.N.d.V. (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2005. Circular Nº 175/2005/CGPE/DIPOA - Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. In: MAPA (ed.), 175. MAPA, Brasília.
- Brasil, 2014. Aves, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>, 02/12/2014

- Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L., & Daube, G., 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection* 71:35-45.
- Goksoy, E.O., Kirkan, S., & Kok, F., 2004. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. *Poultry Science* 83:1427-1432.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Mead, G.C., Howell, M., & Allen, V.M., 2006. An assessment of sampling methods and microbiological hygiene indicators for process verification in poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection* 69:145-153.
- Jimenez, S.M., Tiburzi, M.C., Salsi, M.S., Pirovani, M.E., & Moguilevsky, M.A., 2003. The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. *Journal of Applied Microbiology* 95:451-456.
- Lindblad, M., Lindmark, H., Lambertz, S.T., & Lindqvist, R., 2006. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. *Journal of Food Protection* 69:2875-2882.
- Lopes, M., Galhardo, J.A., Oliveira, J.T., Tamanini, R., Sanches, S.F., & Muller, E.E., 2007. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina: Ciências Agrárias* 28:465-476.
- Matias, B.G., Pinto, P.S., Cossi, M.V., & Nero, L.A., 2010. *Salmonella* spp. and hygiene indicator microorganisms in chicken carcasses obtained at different processing stages in two slaughterhouses. *Foodborne Pathogens and Disease* 7:313-318.
- Milios, K.T., Drosinos, E.H., & Zoiopoulos, P.E., 2014. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria – a review. *Food Control* 43:74-81.
- Nogrady, N., Kardos, G., Bistyak, A., Turcsanyi, I., Meszaros, J., Galantai, Z., Juhasz, A., Samu, P., Kaszanyitzky, J.E., Paszti, J., & Kiss, I., 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* *Infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 127:162-167.
- Reij, M.W. & Den Aantrekker, E.D., 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* 91:1-11.
- Rodrigues, A.C.A., Pinto, P.S.A., Vanetti, M.C.D., Bevilacqua, P.D., Pinto, M.S., & Nero, L.A., 2008. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. *Ciência Rural* 38:1948-1953.
- Smith, D.P., Cason, J.A., & Berrang, M.E., 2005. Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. *Journal of Food Protection* 68:1340-1345.

- Tirolli, I.C.C. & Costa, C.A., 2006. Ocorrência de Salmonella spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazonica* 36:205-208.
- Tsola, E., Drosinos, E.H., & Zoiopoulos, P., 2008. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control* 19:423-431.
- UBABEF, 2014. Relatório Anual 2014, p. 55p. In: Avicultura, U.B.d. (ed.), São Paulo, SP, Brasil.
- USDA/FSIS, 2014. Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges. , p. 19p. In: Service, U.S.D.o.A.F.S.a.I. (ed.).
- Vaidya, V.M., Paturkar, A.M., Waskar, V.S., Zende, R.J., & Rawool, D.B., 2005. Detection of indicator organisms on poultry carcass sites in an organized slaughterhouse. *Journal of Muscle Foods* 16:289-297.
- Yashoda, K.P., Sachindra, N.M., Sakhare, P.Z., & Rao, D.N., 2001. Microbiological quality of broiler chicken carcasses processed hygienically in a small scale poultry processing unit. *Journal of Food Quality* 24:249-259.
- Zweifel, C., Althaus, D., & Stephan, R., 2015. Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. *Food Control* 51:37-42.

Tabela 1. Número de amostras e procedimentos de coletas em diferentes etapas do abate e processamento de frango em dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

Etapa	Amostra	Especificação	Código	Mt1	Mt2	Método de coleta de amostras	Unidade de medida
Recepção	Caixa	Caixas de transporte	T	17	13	Swab <sup>1</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
Abate	Carcaça	Após depenagem	C1	27	24	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
		Após evisceração	C2	28	24	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
		Após pré-resfriamento	C3	25	24	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
Processamento	Faca	-	F	11	7	Swab <sup>1</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
	Esteira	Esteiras de cortes	E	11	7	Swab <sup>1</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
	Mãos	Mãos dos funcionários	M2	11	7	Swab <sup>1</sup>	UFC/cm <sup>2</sup>
Cortes	Coxa	-	C	11	2	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
	Asa	-	A	12	2	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
	Peito	-	P	12	2	Enxágue <sup>2</sup>	UFC/g
Total	-	-	-	165	112	-	-

<sup>1</sup>: coleta em 400cm<sup>2</sup>

<sup>2</sup>: USDA/FSIS, 2014

Tabela 2: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/cm<sup>2</sup> de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) nas caixas de transportes de frango de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2).

Indicador de higiene	Mt1	Mt2	ANOVA
AM	5,875 $\pm$ 0,486	5,946 $\pm$ 0,614	F: 0,120, GL: 1, p: 0,731
EB	4,466 $\pm$ 0,904	4,751 $\pm$ 0,715	F: 0,710, GL: 1, p: 0,408
CT	4,595 $\pm$ 0,753	4,578 $\pm$ 0,675	F: 0,003, GL: 1, p: 0,955
EC	4,522 $\pm$ 0,703	4,338 $\pm$ 0,576	F: 0,401, GL: 1, p: 0,533

ANOVA: análise de variância; GL: grau de liberdade; p:nível de significância (p < 0,05)

Tabela 3: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em carcaças de frango após três diferentes etapas do abate em dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2).

Indicador de higiene	Etapa	Mt1	Mt2	ANOVA
AM	C1	5,595 $\pm$ 0,605 <sup>a</sup>	4,782 $\pm$ 0,324 <sup>b</sup>	F: 162,453, GL: 5, p < 0,0001
	C2	5,484 $\pm$ 0,750 <sup>a</sup>	4,788 $\pm$ 0,344 <sup>b</sup>	
	C3	1,192 $\pm$ 0,984 <sup>d</sup>	3,665 $\pm$ 0,316 <sup>c</sup>	
EB	C1	4,926 $\pm$ 0,527 <sup>a</sup>	4,167 $\pm$ 0,392 <sup>b</sup>	F: 103,707, GL: 5, p < 0,0001
	C2	4,902 $\pm$ 0,633 <sup>a</sup>	4,140 $\pm$ 0,451 <sup>b</sup>	
	C3	0,504 $\pm$ 1,191 <sup>d</sup>	2,892 $\pm$ 0,704 <sup>c</sup>	
CT	C1	4,719 $\pm$ 0,611 <sup>a</sup>	3,947 $\pm$ 0,428 <sup>b</sup>	F: 95,284, GL: 5, p < 0,0001
	C2	4,708 $\pm$ 0,613 <sup>a</sup>	4,016 $\pm$ 0,412 <sup>b</sup>	
	C3	0,335 $\pm$ 1,234 <sup>d</sup>	2,540 $\pm$ 0,755 <sup>c</sup>	
EC	C1	4,533 $\pm$ 0,589 <sup>a</sup>	3,739 $\pm$ 0,480 <sup>b</sup>	F: 71,560, GL: 5, p < 0,0001
	C2	4,445 $\pm$ 0,627 <sup>a</sup>	3,711 $\pm$ 0,282 <sup>b</sup>	
	C3	0,602 $\pm$ 1,204 <sup>d</sup>	2,329 $\pm$ 0,899 <sup>c</sup>	

ANOVA: análise de variância; GL: grau de liberdade; p:nível de significância (p < 0,05); C1: após depenagem; C2: após evisceração; C3: após pré-resfriamento (chiller final)

Obs: Valores em uma mesma linha e/ou coluna com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística.

Tabela 4: Média ( $\pm$  desvio padrão) de valores encontrados para temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e teor de cloro (ppm) no final do tanque de pré-resfriamento (chiller final) de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2).

Parâmetro	Mt1	Mt2
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$0,925 \pm 0,67$	$8,0 \pm 1,732$
Cloro (ppm)	$3,085 \pm 0,742$	$1,625 \pm 2,286$

Tabela 5: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/cm<sup>2</sup> de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em amostras do ambiente de processamento de dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2).

Indicador de higiene	Ambiente	Mt1	Mt2	ANOVA
AM	Esteira	3,183 $\pm$ 0,693 <sup>b</sup>	4,116 $\pm$ 0,873 <sup>a</sup>	F: 4,99, GL: 1, p: 0,045
	Faca	2,852 $\pm$ 0,810 <sup>b</sup>	4,518 $\pm$ 0,840 <sup>a</sup>	F: 14,089, GL: 1, p: 0,003
	Mão	2,589 $\pm$ 0,752 <sup>b</sup>	4,418 $\pm$ 0,728 <sup>a</sup>	F: 22,680, GL: 1, p: 0,000
EB	Esteira	2,346 $\pm$ 0,873 <sup>a</sup>	2,952 $\pm$ 1,006 <sup>a</sup>	F: 1,558, GL: 1, p: 0,234
	Faca	1,817 $\pm$ 0,929 <sup>b</sup>	3,281 $\pm$ 1,045 <sup>a</sup>	F: 8,103, GL: 1, p: 0,014
	Mão	1,911 $\pm$ 0,606 <sup>b</sup>	3,386 $\pm$ 0,462 <sup>a</sup>	F: 24,570, GL: 1, p: 0,000
CT	Esteira	2,001 $\pm$ 0,492 <sup>a</sup>	2,300 $\pm$ 0,305 <sup>a</sup>	F: 1,868, GL: 1, p: 0,197
	Faca	1,511 $\pm$ 0,571 <sup>b</sup>	3,237 $\pm$ 1,066 <sup>a</sup>	F: 13,846, GL: 1, p: 0,003
	Mão	1,240 $\pm$ 0,545 <sup>b</sup>	3,209 $\pm$ 0,571 <sup>a</sup>	F: 42,897, GL: 1, p < 0,0001
EC	Esteira	1,191 $\pm$ 0,500 <sup>b</sup>	2,438 $\pm$ 0,559 <sup>a</sup>	F: 11,104, GL: 1, p: 0,045
	Faca	1,511 $\pm$ 0,473 <sup>a</sup>	3,111 $\pm$ 1,070 <sup>a</sup>	F: 3,871, GL: 1, p: 0,097
	Mão	1,413 $\pm$ 0,508 <sup>b</sup>	3,175 $\pm$ 0,505 <sup>a</sup>	F: 29,025, GL: 1, p: 0,001

ANOVA: análise de variância; GL: grau de liberdade; p: nível de significância ( $p < 0,05$ )

Obs: nas colunas Mt1 e Mt2, letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores médios apresentados nas respectivas linhas.

Tabela 6: Média de contagem ( $\pm$  desvio padrão) em log UFC/g de aeróbios mesófilos (AM), Enterobacteriaceae (EB), Coliformes Totais (CT) e Escherichia coli (EC) em amostras cortes finais de frangos em dois matadouros distintos (Mt1 e Mt2).

Indicador de higiene	Corte	Mt1	Mt2	ANOVA
AM	Peito	2,519 $\pm$ 0,467 <sup>b</sup>	4,719 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	F: 20,275, GL: 1, p: 0,001
	Coxa	2,602 $\pm$ 0,562 <sup>b</sup>	4,966 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	F: 16,028, GL: 1, p: 0,003
	Asa	2,480 $\pm$ 0,516 <sup>b</sup>	5,066 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	F: 22,575, GL: 1, p: 0,001
EB	Peito	1,783 $\pm$ 0,486 <sup>b</sup>	3,261 $\pm$ 0,825 <sup>a</sup>	F: 12,960, GL: 1, p: 0,005
	Coxa	1,686 $\pm$ 0,790 <sup>b</sup>	3,822 $\pm$ 0,147 <sup>a</sup>	F: 13,471, GL: 1, p: 0,004
	Asa	1,614 $\pm$ 0,681 <sup>b</sup>	3,585 $\pm$ 0,558 <sup>a</sup>	F: 14,401, GL: 1, p: 0,004
CT	Peito	1,475 $\pm$ 0,531 <sup>b</sup>	3,106 $\pm$ 0,807 <sup>a</sup>	F: 14,262, GL: 1, p: 0,003
	Coxa	1,413 $\pm$ 0,615 <sup>b</sup>	3,128 $\pm$ 0,642 <sup>a</sup>	F: 12,843, GL: 1, p: 0,005
	Asa	1,410 $\pm$ 0,759 <sup>b</sup>	3,148 $\pm$ 0,250 <sup>a</sup>	F: 9,591, GL: 1, p: 0,011
EC	Peito	1,086 $\pm$ 0,536 <sup>b</sup>	2,759 $\pm$ 1,044 <sup>a</sup>	F: 13,136, GL: 1, p: 0,004
	Coxa	1,136 $\pm$ 0,436 <sup>b</sup>	2,833 $\pm$ 0,732 <sup>a</sup>	F: 19,664, GL: 1, p: 0,002
	Asa	1,325 $\pm$ 0,694 <sup>b</sup>	2,863 $\pm$ 0,971 <sup>a</sup>	F: 7,449, GL: 1, p: 0,021

ANOVA: análise de variância; GL: grau de liberdade; p: nível de significância ( $p < 0,05$ )

Obs: nas colunas Mt1 e Mt2, letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores médios apresentados nas respectivas linhas.

Tabela 7: Frequência de carcaças em três pontos distintos de dois matadouros (Mt1 e Mt2) que apresentaram médias de contaminação superior ao parâmetro estabelecido (média acrescida de desvio padrão).

Indicador de Higiene	Mt1			Mt2			Estatística
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
AM	6 (22,2%)	7 (25,0%)	3 (12,0%)	4 (16,7%)	4 (16,7%)	4 (16,7%)	$\chi^2$ : 1.90, GL: 5, p: 0,863
EB	3 (11,1%)	5 (17,9%)	2 (8,0%)	4 (16,7%)	1 (4,2%)	2 (8,3%)	$\chi^2$ : 3,62, GL: 5, p: 0,605
CT	4 (14,8%)	6 (21,4%)	2 (8,0%)	4 (16,7%)	3 (12,5%)	2 (8,3%)	$\chi^2$ : 2.90, GL: 5, p: 0,715
EC	4 (14,8%)	6 (21,4%)	1 (4,0%)	5 (20,8%)	3 (12,5%)	4 (16,7%)	$\chi^2$ : 4.06, GL: 5, p: 0,541
n	27	28	25	24	24	24	

n: número de amostras;  $\chi^2$ : Qui-quadrado; GL: grau de liberdade; p: nível de significância ( $p < 0,05$ ); C1: após depenagem; C2: após evisceração; C3: após pré-resfriamento (chiller final)

**CAPÍTULO 2. Rastreamento molecular de Salmonella spp. na linha de abate e  
processamento de frangos**

Mariane Rezende Dias et al.

## RESUMO

Devido a importância de *Salmonella* spp. em produtos avícolas, esse estudo teve como objetivo caracterizar por ferramentas moleculares as origens desse patógeno na linha de abate e processamento de frangos. Amostras de diferentes etapas da recepção, abate e processamento de carne de frango (n = 277) foram coletadas em dois matadouros de aves (Mt1 e Mt2) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, e submetidas a pesquisa de *Salmonella* spp. Os isolados obtidos foram submetidos a macro-restrição com XbaI e PFGE. Sessenta e oito amostras apresentaram *Salmonella* spp., e 172 isolados foram identificados como o patógeno. Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de amostras positivas para *Salmonella* spp. obtidas em Mt1 e Mt2 na recepção, ambiente de processamento e cortes finais ( $p > 0,05$ ). Nas etapas do abate, foram observadas maiores frequências de resultados positivos para *Salmonella* spp. em Mt1, nas etapas após a depenagem e após a evisceração, quando comparadas à Mt2 e à etapa após pré-resfriamento ( $p < 0,05$ ). Os resultados evidenciam a importância das etapas iniciais do abate como fontes de contaminação por *Salmonella* spp., e da etapa de pré-resfriamento como controle da contaminação. A análise dos perfis genéticos dos isolados identificados como *Salmonella* spp. permitiu a identificação de rotas de contaminação pelo patógeno em Mt1, além de sua persistência nesse estabelecimento; isolados obtidos no abate e processamento apresentaram perfis genéticos idênticos a isolados obtidos na recepção, e isolados obtidos de diferentes lotes e diferentes coletas também apresentaram perfis genéticos idênticos. Os resultados obtidos demonstraram a importância de *Salmonella* spp. na linha de abate e processamento de frangos e as principais rotas de contaminação por esse patógeno.

Palavras-chave: *Salmonella* spp, PFGE, carne de frango, rotas de contaminação

## ABSTRACT

Due to the importance of *Salmonella* spp. in poultry products, this study aimed to characterize the origin of this pathogen during slaughter and processing of poultry by using molecular tools. Samples from different steps of reception, slaughtering, and processing of chickens ( $n = 277$ ) were collected from two poultry slaughterhouses (Mt1 and Mt2) located in Minas Gerais state, Brazil, and were subjected to the study of *Salmonella* spp. The isolates were subjected to macro-restriction by using XbaI and PFGE. Sixty-eight samples presented with *Salmonella* spp. and 172 isolates were identified. Significant differences were not identified between the frequencies of positive samples for *Salmonella* spp. obtained for Mt1 and Mt2 in the reception, slaughtering, and processing (such as end cuts) steps ( $P > 0.05$ ). In the slaughtering process, greater frequencies of positive results for *Salmonella* spp. were observed for Mt1 after de-feathering and evisceration when compared to Mt2 and after the pre-cooling step ( $P < 0.05$ ). The results highlighted the importance of initial slaughtering steps as contamination sources by *Salmonella* spp., and the pre-cooling step as a contamination control. PFGE allowed for the identification of contamination routes by *Salmonella* spp. for Mt1, as well as identification of its persistence in this establishment. Isolates that were obtained during the slaughtering and processing presented identical pulsotypes to those obtained during the reception, as well as isolates that were obtained from different lots and sampling also presented with pulsotypes. The results showed the importance of *Salmonella* spp. during slaughtering and processing of poultry and the main contamination routes by this pathogen.

Key words: *Salmonella* spp, PFGE, chicken, contamination routes

## INTRODUÇÃO

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estima que a cada ano cerca de 48 milhões de norte-americanos ficam doentes, 128 mil são hospitalizadas e 3.000 morrem em decorrência de doenças de origem alimentar (CDC, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou que em 2011 ocorreram 795 surtos, resultando em aproximadamente 20.000 pessoas doentes (Brasil, 2013). Mesmo sendo informações subestimadas, esses dados demonstram a importância das doenças de origem alimentar em saúde pública.

A salmonelose se destaca entre as doenças de origem alimentar como uma das mais importantes, sendo responsável por milhões de animais e humanos doentes e prejuízos para as indústrias de alimentos (Nogrady et al., 2008). Nos Estados Unidos são relatados anualmente aproximadamente 42.000 casos de salmonelose (CDC, 2014), e no Brasil, *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais envolvido nas doenças de origem alimentar notificadas e investigadas (Brasil, 2013). Alimentos de origem animal são considerados importantes veículos de *Salmonella* spp. para os seres humanos, sendo os surtos de doenças causados por esse patógeno frequentemente associados a ovos, carne de aves e de suínos (Cheong et al., 2007; Kim et al., 2007; Lee et al., 2007; Wang et al., 2013).

Considerando a carne de frango como uma importante fonte de contaminação por *Salmonella* spp., é importante que sejam conhecidos os principais pontos de sua cadeia produtiva que determinam a contaminação final nesse produto. Durante o abate, todas as etapas podem contribuir para a contaminação das carcaças e do produto final, com destaque para as etapas de transporte, depenagem, evisceração, pré-resfriamento e processamento final (Corry et al., 2002; Goksoy et al., 2004; Heyndrickx et al., 2002;

Lopes et al., 2007; Nogrady et al., 2008; Olsen et al., 2003; Rasschaert et al., 2007; Rasschaert et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Von Rückert et al., 2009).

Dessa forma, a investigação da ocorrência e distribuição de *Salmonella* spp. nas diferentes etapas do abate é essencial na adoção de medidas corretivas e preventivas, para minimizar a contaminação da carne de frango (Wang et al., 2013). Nesse contexto, destaca-se a importância de ferramentas moleculares que, além de possibilitarem um resultado em menor tempo, permitem o rastreamento das possíveis fontes de contaminação, uma vez que propiciam resultados mais precisos que as técnicas convencionais (Akiba et al., 2011; Alvarez et al., 2004; Liu et al., 2011; Steve Yan et al., 2003). A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é uma ferramenta molecular frequentemente utilizada em estudos dessa natureza, pois permite a comparação de dois ou mais isolados bacterianos para se obter um sentido de parentesco genômico, geralmente num contexto epidemiológico (Goering, 2010).

Devido a relevância de *Salmonella* spp. na avicultura, o objetivo do presente estudo foi identificar as origens da contaminação deste patógeno em diferentes etapas da linha de abate e processamento de frangos, desde a recepção das aves até o processamento de produtos finais, utilizando metodologias convencionais e moleculares, e assim estabelecer as possíveis rotas de contaminação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Matadouros e amostragem**

Dois matadouros localizados no estado de Minas Gerais, Brasil, foram incluídos no estudo, após consentimento dos proprietários. Ambos os estabelecimentos

desenvolvem suas atividades sob fiscalização oficial, e apresentam as seguintes características:

- ✓ Matadouro 1 (Mt1): estabelecimento considerado como de grande porte, com abate médio de 180.000 aves por dia, linha de evisceração mecanizada, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, habilitado à exportação, e utiliza o sistema de integração;
- ✓ Matadouro 2 (Mt2): estabelecimento considerado como de pequeno porte, com abate médio de 3.500 a 4.000 aves por dia, linha de evisceração manual, fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Municipal.;

Cada matadouro foi visitado 5 vezes em um período de 9 meses (Janeiro a Setembro de 2014), quando amostras de pontos específicos dos ambientes de recepção de aves, abate e processamento e de produtos finais foram coletadas (Tabela 1). Considerando as etapas de recepção e abate, foram estudados nove lotes em Mt1 (denominados 1 a 9) e cinco lotes em Mt2 (denominados 10 a 14). A fim de garantir que as carcaças coletadas após a etapa de pré-resfriamento correspondessem ao mesmo lote coletado nas etapas iniciais de abate, as carcaças foram identificadas antes de serem submersas no tanque de pré-resfriamento. A coleta de amostras de carcaças e cortes (coxa, peito e asa) foi realizada conforme a metodologia de enxague recomendada pelo USDA (USDA/FSIS, 2014); a amostra coletada era acondicionada em uma bolsa plástica estéril, pesada, e adicionada de 400 mL de Tampão Fosfato, pH 7,2, com posterior agitação. Em seguida, o homogenato obtido foi transferido para um recipiente estéril e mantido sob refrigeração até a análise. Amostras de superfícies (caixas de transporte, esteiras de cortes, mãos de funcionários e facas) foram coletadas por swab com auxílio de esponjas estéreis pré-umedecidas com 40 mL de Tampão Fosfato pH 7,2, em quatro regiões de 100 cm<sup>2</sup> da mesma superfície. Em seguida, as 4 esponjas

utilizadas por amostra eram acondicionadas em uma bolsa estéril com 160 mL de Tampão Fosfato pH 7,2, completando um volume final de 200 mL, correspondente a 400 cm<sup>2</sup> amostrados. Os conjuntos eram mantidos sob refrigeração até o início das análises.

Todas as amostras obtidas foram homogeneizadas em homogeneizador peristáltico (Stomacher 400 circulator, Seward, Worthing, England) antes da realização das análises laboratoriais.

### **Pesquisa de *Salmonella* spp.**

As amostras coletadas foram submetidas a pesquisa de *Salmonella* spp. considerando as metodologias preconizadas pela USDA/FSIS (2014) e ISO (2002). Na primeira etapa, 30 mL dos homogenatos obtidos de carcaças e cortes foram transferidos para recipientes com 30 mL de água peptonada tamponada a 4% (m/v) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), e incubados a 37 °C por 24 h (USDA/FSIS, 2014). Em relação as amostras ambientais, 25 mL dos homogenatos obtidos foram transferidos para recipientes com 225 mL de água peptonada tamponada 1% (m/v) (Oxoid), e incubados a 37 °C por 24 h. A partir dessa etapa, apenas a metodologia ISO 6579 foi considerada (ISO, 2002): alíquotas de 1 mL e 0,1 mL das culturas obtidas foram transferidas para caldo Tetrionato Muller-Kauffmann suplementado com novobiocina (Oxoid) e caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid), e incubadas a 37 °C e 42,5 °C, respectivamente, por 24 h. Em seguida, alíquotas das culturas foram estriadas em placas contendo ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid) e ágar Verde Brilhante (BD, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e incubadas a 37 °C por 24 h. Colônias com características típicas de *Salmonella* spp. foram transferidas para ágar Tríplice Açúcar Ferro (Oxoid) e ágar Lisina Ferro (Oxoid) e incubadas a 37°C por 24 h. As culturas que

apresentaram reações típicas para *Salmonella* spp. foram submetidas a testes sorológicos com os anti-soros polivalente somático e polivalente flagelar (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

As culturas que apresentaram reações positivas para *Salmonella* spp. na identificação sorológica foram submetidas a extração de DNA utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corp Madison, WI, USA), e a reação de PCR para identificação de dois genes típicos de *Salmonella* spp.: *ompC*, conforme descrito por Alvarez et al. (2004), e *sifB*, conforme descrito por Almeida et al. (2014).

### **Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

Os isolados identificados como *Salmonella* spp. por PCR foram submetidos à macro-restrição do DNA com a enzima *XbaI* e à eletroforese em gel de campo pulsado, como indicado pelo PulseNet (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), seguindo o protocolo descrito por Ribot et al. (2006). Brevemente, os plugs dos isolados foram sujeitos à macro-restrição com 50 U da enzima *XbaI* (Promega) a 37 °C por 2 h, e os produtos oriundos da macro-restrição foram então separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose Seakem Gold 1% em Tampão TE 0,5X) utilizando o equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) com os seguintes parâmetros: switch time inicial de 2,2s, switch time final de 63,8s, ângulo de 120°, 6V/cm, tempo de corrida de 18h. Os géis obtidos foram corados em banho de GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), sendo os padrões de digestão visualizados sob luz ultra violeta.

### **Análise dos dados**

As frequências de resultados positivos para *Salmonella* spp. das carcaças de frango durante o processo de abate nos dois frigoríficos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ( $p < 0,05$ ), e posteriormente pelo procedimento de Marascuilo para comparação pareada ( $p < 0,05$ ), utilizando o software XLSat 2010.2.03 (AddinSoft, New York, NY, EUA). Os padrões de restrição obtidos por PFGE foram analisados usando BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Bélgica), considerando otimização de 1%, e coeficiente de Dice a 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos para presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas são apresentados na Tabela 2. Das 277 amostras coletadas, 68 (24,5%) foram positivas para *Salmonella* spp., e 172 isolados foram identificados como esse patógeno pelos testes sorológicos e por apresentarem produtos de PCR com 204 bp e 498 pb, típicos para *ompC* e *sifB* respectivamente, conforme Alvarez et al. (2004) e Almeida et al. (2014). Como pode ser verificado na Tabela 2, não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de amostras positivas para *Salmonella* spp. nas caixas de transporte de aves nos dois matadouros. Embora a diferença não seja significativa, a frequência de caixas de transporte positivas para *Salmonella* spp. em Mt1 foi substancialmente superior quando comparada a Mt2, indicando que a etapa recepção de frangos pode ser considerada um ponto importante de contaminação dos produtos finais por favorecer a entrada do patógeno no estabelecimento através de aves contaminadas. Outros autores também descreveram a recepção de frangos contaminados, evidenciados na contaminação das caixas para transporte, como importantes fontes de contaminação em matadouros, indicando que a contaminação intrínseca dos frangos favorece a entrada de patógenos no interior dos estabelecimentos (Corry et al., 2002; Olsen et al., 2003;

Rasschaert et al., 2007). Contudo, Slader et al. (2002) demonstraram que quando as aves são criadas em condições controladas de contaminação e possuem o status de livres de *Salmonella* spp. as caixas não representam fontes importantes de contaminação por esse patógeno na cadeia produtiva.

Na Tabela 2 também pode ser verificado as diferenças significativas que ocorreram entre as frequências de amostras positivas para *Salmonella* spp. no ambiente de abate dos dois matadouros analisados. C1 (após depenagem) e C2 (após evisceração) em Mt1 apresentaram maiores frequências de contaminação em relação a C1 e C2 em Mt2 e em relação a C3 (após pré-resfriamento) em Mt1 e Mt2 ( $p < 0,05$ ). Pode-se inferir com esses resultados que Mt1 apresentou problemas de contaminação nas primeiras etapas do abate, o que pode ser explicado devido à grande quantidade de aves e alta velocidade em que são processadas, além da utilização de sistema automatizado de evisceração, o que pode determinar um controle deficiente do processo e facilitar a contaminação microbiológica. Entretanto, a etapa de pré-resfriamento (C3) em Mt1 foi eficiente para reduzir a contaminação por *Salmonella* spp. nas carcaças (Tabela 2,  $p < 0,05$ ), evidenciando a importância dessa etapa no controle da contaminação do produto. Mt2 apresentou apenas uma amostra contaminada por *Salmonella* spp. (C2, Tabela 2), indicando que esse estabelecimento apresenta o processo de recepção e abate controlado em relação a esse patógeno; o que pode ser explicado por ser considerado de pequeno porte, com menor volume de aves processadas por dia e com uma linha de evisceração manual, o que determina uma menor velocidade de processamento e um controle mais efetivo de eventuais falhas no processo, como rupturas de vísceras. Resultados semelhantes foram encontrados por Von Rückert et al. (2009), que constataram maior contaminação por *Salmonella* spp. nas etapas iniciais do abate de aves, sendo o pré-resfriamento em tanques a única etapa que exerceu controle efetivo sobre a contaminação das carcaças. Wang et al. (2013) encontraram 35% de amostras de

carcaças de aves positivas para *Salmonella* spp. na etapa de evisceração, com redução significativa para 19% após pré-resfriamento ( $p < 0,05$ ). A variação das frequências de contaminação por *Salmonella* spp. nas diversas etapas do abate de aves pode variar, dependendo de condições específicas dos estabelecimentos pesquisados. Goksoy et al. (2004) demonstraram a importância das etapas após depenagem e após evisceração para a contaminação por *Salmonella* spp. em carcaças de aves, assim como a etapa de pré-resfriamento em um dos estabelecimentos estudados. Lillard (1990) também observou um aumento da contaminação por *Salmonella* spp. em carcaças de aves após a etapa de pré-resfriamento em comparação às etapas iniciais do abate, atribuindo esse resultado à possível contaminação cruzada nos tanques de pré-resfriamento. Em estudo desenvolvido por Abu-Ruwaida et al. (1994), *Salmonella* spp. foi identificado em todas as etapas do abate de aves amostradas em um matadouro localizado no Kuwait; entretanto, apenas 11 amostras foram coletadas no estudo, o que indica uma disseminação localizada no momento do estudo.

Considerando essas evidências, a etapa de pré-resfriamento deve ser caracterizada como crítica, já que pode determinar altos níveis de contaminação por *Salmonella* spp. em carcaças de aves, assim como pode ser a etapa principal para redução ou eliminação desse patógeno. Essa grande diferença no papel dessa etapa no abate de aves pode ser creditada aos diferentes processos que podem ser utilizados, como tanques de imersão, aspersão, ou ar frio, que demandam diferentes medidas de controle e monitoramento, assim como particularidades observadas em cada matadouro. O uso de tanques de imersão, por exemplo, resulta em uma menor contaminação das carcaças quando as condições de concentração de cloro, temperatura, fluxo, potabilidade, volume e renovação adequados de água, entre outros fatores, são eficientemente controlados: caso contrário, o contato entre as carcaças possibilita a

contaminação cruzada entre elas (Allen et al., 2000; James et al., 2006; Rasschaert et al., 2008).

Não foram observadas diferenças significativas entre os matadouros estudados em relação a frequências de amostras positivas para *Salmonella* spp. no ambiente de processamento e nos cortes finais (Tabela 2). Mt1 apresentou algumas amostras de cortes contaminadas por *Salmonella* spp., o que pode ser explicado pela ocorrência desse patógeno nas carcaças obtidas no ambiente de abate. No ambiente de processamento, apenas uma amostra de faca em Mt1 (9%) e uma amostra de esteira de cortes em Mt2 (14,2%) apresentaram resultados positivos para *Salmonella* spp. Apesar de serem observadas baixas frequências de *Salmonella* spp. nos ambientes de processamento de Mt1 e Mt2, a presença do patógeno nesses locais pode representar um risco para contaminação cruzada, e conseqüente risco à saúde pública, indicando assim a necessidade de medidas higiênicas mais rigorosas, conforme descrito por Wang et al. (2013).

A macro-restrição enzimática e definição do perfil genético por PFGE não foi possível para apenas 24 isolados identificados como *Salmonella* spp. As Figuras 1, 2 e 3 apresentam os perfis de macro-restrição dos isolados, agrupados pelas diferentes etapas da cadeia produtiva da carne de aves (recepção, abate e processamento, respectivamente). Foi possível a macro-restrição de apenas um isolado obtido da esteira de cortes em Mt2, que não foi idêntico a nenhum outro isolado, impossibilitando assim a comparação do perfil genético com aqueles obtidos em Mt1. Considerando esses resultados, foi possível realizar a subtipagem de 11 dos 16 isolados obtidos de caixas de transporte de aves identificados como *Salmonella* spp., sendo agrupados em 9 pulsotipos, denominados R-1 a R-9 (Figura 1). Todos esses pulsotipos, exceto R-9, foram compostos por apenas um isolado. R-9 foi o único que foi composto por três isolados, sendo todos do mesmo lote. Os lotes analisados que apresentaram resultados

positivos para *Salmonella* spp. apresentaram isolados com diferentes perfis genéticos, indicando uma contínua inclusão de novas cepas no matadouro proveniente das granjas de produção das aves. Além disso, foi possível observar que um mesmo lote pode apresentar diferentes perfis genéticos, como por exemplo o lote 2, que apresentou pulsotipo R-5 e R-6, evidenciando ainda a diversidade de isolados em uma mesma granja. Resultados evidenciando a diversidade genética dos isolados obtidos em granjas e sua disseminação em matadouros foram também observados por Kim et al. (2007).

Na Figura 2 pode-se observar os resultados da restrição enzimática de 132 isolados de carcaças de frango identificados como *Salmonella* spp., que apresentaram 41 pulsotipos (S-1 a S-41) que foram agrupados em 5 clusters. O Cluster I agrupou 47 isolados, que apresentaram similaridade igual ou superior a 85,7% (pulsotipos S-1 a S-15). Foi possível observar nesse Cluster que isolados obtidos em diferentes etapas do abate, e/ou oriundos de diferentes lotes, apresentaram mesmos perfis genéticos (pulsotipos S-3, S-6, S-9, S-10, e S-13). No Cluster II, 23 isolados compartilharam 86,4% ou mais de similaridade (S-16 a S-21), sendo possível identificar que quase todos eram provenientes do lote 9, sendo apenas um proveniente do lote 8; ainda, o pulsotipo S-17 incluiu isolados de um mesmo lote que foram obtidos em diferentes etapas do abate (C1 e C2). Já no Cluster III, observa-se que 28 isolados apresentaram 84,3% ou mais de similaridade (S-22 a S-28); nesse cluster, ficou evidenciada a presença de isolados com perfis idênticos obtidos em diferentes etapas do abate, e/ou oriundos de diferentes lotes, mais especificamente os pulsotipos S-22 e S-25. No Cluster IV, 33 isolados compartilharam 89,8% ou mais de similaridade (S-29 a S-40), sendo identificados nos pulsotipos S-29, S-30, S-33, S-34, S-35 e S-38 isolados obtidos em diferentes etapas do abate, e/ou de diferentes lotes, com perfis genéticos idênticos. Apenas um isolado foi incluído no Cluster V, que compartilhou 69,9% de similaridade com os demais Clusters. Os Clusters I e IV foram os únicos grupos onde foi possível

identificar a presença de isolados obtidos após as três etapas de abate estudadas (após depenagem, após evisceração, e após chiller) com perfis genéticos idênticos, ou seja, mesmo pulsotipo (S-10 e S-34).

Já na Figura 3, referente à macro-restrição dos isolados obtidos do ambiente de processamento e dos cortes finais, observa-se que foi possível a subtipagem apenas do isolado obtido da esteira de cortes, sendo este isolado pertencente a um pulsotipo (P-1) que não foi idêntico geneticamente a nenhum outro. Com relação aos cortes, observa-se que dos seis isolados obtidos de cortes, foi possível a subtipagem de apenas quatro isolados obtidos das asas, sendo que cada um desses isolados foi agrupado em um pulsotipo diferente (C-1 a C-4), evidenciando as diferenças genéticas dos isolados entre os cortes obtidos de uma mesma linha de processamento.

Considerando os resultados de subtipagem, é interessante notar que isolados obtidos de diferentes lotes, coletados entre Janeiro e Setembro de 2014, apresentaram perfis genéticos idênticos, evidenciando a persistência desses isolados entre os animais obtidos de diferentes granjas. Além disso, pode-se identificar que isolados obtidos na etapa de recepção (caixas de transporte) apresentaram perfis genéticos idênticos a isolados obtidos na etapa de abate (C1, C2 e C3); analisando as Figuras 1 e 2, os seguintes pulsotipos são idênticos: R-1 e S-10; R-3 e S-19; R-7 e S-6; R-9 e S-25. Outro isolado ainda obtido nas caixas de transporte, além de apresentar perfil genético idêntico ao de isolados obtidos após depenagem e após evisceração, também apresentou perfil igual aos isolados obtidos do corte de asa (Figuras 1, 2 e 3: R-4, S-29, C-4). Nota-se também que muitos desses isolados com perfis idênticos oriundos de etapas diferentes são ainda provenientes de lotes distintos, indicando uma possível contaminação cruzada entre as partes externas e internas do estabelecimento, além de persistência ou reintrodução de isolados com perfis idênticos no matadouro no qual as amostras foram obtidas.

Diversos estudos semelhantes buscando o rastreamento dos possíveis pontos de contaminação por *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de aves podem ser encontrados. No estudo desenvolvido por Chen et al. (2011), nota-se através da análise de PFGE a persistência de *Salmonella* spp. com perfis genéticos idênticos ao longo de seis anos de estudos realizados com amostras de carne de frango, demonstrando a circulação das cepas ao longo na cadeia produtiva. Lee et al. (2007) observaram perfis genéticos idênticos de *Salmonella* spp. isolados em granjas, incubatórios e carcaças obtidas em matadouros, demonstrando a importância da etapa de criação como fonte de contaminação do produto final, assim como demonstrado por Kim et al. (2007). No estudo realizado por Nogrady et al. (2008), diferentes amostras foram coletadas nas granjas e nos matadouros, além de amostras de fezes humanas, resultando em 145 isolados, agrupados em 3 Clusters, divididos em 8 pulsotipos no total: no mesmo cluster foi possível observar amostras oriundas de origens distintas com alta similaridade genética, indicando possível contaminação cruzada, e também amostras de mesma origem pertencentes a Clusters diferentes, evidenciando a diversidade genética.

Rasschaert et al. (2008) desenvolveram um estudo de rastreamento da granja ao matadouro a fim de identificar as possíveis fontes de contaminação por *Salmonella* spp., observando que em alguns casos os perfis genéticos obtidos de isolados das carcaças eram diferentes daqueles oriundos do trato gastrointestinal dos animais, indicando possivelmente outras fontes de contaminação das carcaças, como equipamentos de abate e caixas de transporte. Além disso, relataram também que mesmo quando lotes livres de *Salmonella* spp. eram abatidos, as carcaças se encontraram contaminadas, reforçando a ideia de contaminação durante o abate.

No presente estudo não foi possível identificar se os isolados de carcaça e caixas de Mt2 eram idênticos a algum isolado obtido de Mt1. Essa similaridade entre isolados de diferentes matadouros foi observada por Capita et al. (2007), que

encontraram alta relação genética por análise de ribotipagem entre isolados de *Salmonella* spp. obtidos dentro de um mesmo matadouro e de matadouros distintos, e de diferentes lotes, como observado no presente estudo (Figuras 1, 2 e 3). Os resultados obtidos possibilitaram a identificação das possíveis rotas de contaminação das carcaças de frango durante o abate, evidenciando que essa contaminação pode ser proveniente do ambiente externo do matadouro, como a etapa de criação e transporte que possibilitam a contaminação dos animais antes de serem abatidos, ou pode também ser derivada do próprio abate, indicando a persistência de algumas cepas durante a produção. Assim, nota-se a necessidade de implantação de medidas de controle por toda a cadeia produtiva, desde as etapas iniciais de criação dos animais, até as etapas finais de processamento.

De maneira geral, os resultados permitem também observar a importância da carne frango como fonte de *Salmonella* spp., podendo esse alimento estar envolvido nos casos de salmonelose que ocorrem no Brasil. A fim de determinar se os isolados obtidos dos produtos finais no presente estudo poderiam estar associados a essa enfermidade, pesquisas que comparem os perfis genéticos desses isolados com os perfis genéticos de isolados obtidos de amostras clínicas de pessoas enfermas poderiam ser futuramente realizados, como descrito em alguns estudos (Boonmar et al., 1998; Cardinale et al., 2005; Cheong et al., 2007).

## **CONCLUSÃO**

Foi possível observar nesse trabalho que a contaminação por *Salmonella* spp. ainda é um problema crítico na linha de abate e processamento de frango, tendo sido obtidos isolados nas diferentes etapas de produção e demonstrando que a etapa de pré-resfriamento em chiller foi importante na redução da contaminação pelo patógeno.

Além disso, a análise de macro-restrição demonstrou potenciais rotas de contaminação por *Salmonella* spp. na linha de abate e processamento de frango, evidenciando que a recepção de animais contaminados é importante na introdução de novas cepas nos matadouros, bem como as etapas de abate também podem favorecer essa contaminação das carcaças. Finalmente, foi identificado a presença de cepas persistentes no ambiente de abate e processamento em um dos matadouros.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abu-Ruwaida, A.S., Sawaya, W.N., Dashti, B.H., Murad, M., & Al-Othman, H.A., 1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection* 57:887-892.
- Akiba, M., Kusumoto, M., & Iwata, T., 2011. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85:9-15.
- Allen, V.M., Corry, J.E.L., Burton, C.H., Whyte, R.T., & Mead, G.C., 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology* 58:39-48.
- Almeida, M.V., Silva, A.J., & Nero, L.A., 2014. Evaluation of target sequences for the polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in artificially contaminated beef. *Foodborne Pathogens and Disease* 11:111-118.
- Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., & Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1734-1738.
- Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Terajima, J., Watanabe, H., Kaneko, K., & Ogawa, M., 1998. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 36:971-974.
- Brasil, 2013. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos, p. 23p. In: Saúde-MS, M.d. (ed.). Brasília, DF, Brasil.

- Capita, R., Alonso-Calleja, C., & Prieto, M., 2007. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103:1366-1375.
- Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Rivoal, K., Rose, V., Tall, F., Mead, G.C., & Salvat, G., 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology* 99:968-977.
- CDC, 2014. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States, Disponible em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>, 03/12/2014
- Chen, M.H., Hwang, W.Z., Wang, S.W., Shih, Y.C., & Tsen, H.Y., 2011. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolates collected in six years (2000-2005) from retail chicken meat in Taiwan. *Food Microbiology* 28:399-405.
- Cheong, H.J., Lee, Y.J., Hwang, I.S., Kee, S.Y., Cheong, H.W., Song, J.Y., Kim, J.M., Park, Y.H., Jung, J.H., & Kim, W.J., 2007. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and broiler-chickens in southwestern Seoul, Korea. *Journal of Korean Medical Science* 22:773-778.
- Corry, J.E., Allen, V.M., Hudson, W.R., Breslin, M.F., & Davies, R.H., 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology* 92:424-432.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10:866-875.
- Goksoy, E.O., Kirkan, S., & Kok, F., 2004. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. *Poultry Science* 83:1427-1432.
- Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K., & De Zutter, L., 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection* 129:253-265.
- ISO, 2002. ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., p. 27p. In: Standardization, I.O.f. (ed.).
- James, C., Vincent, C., de Andrade Lima, T.I., & James, S.J., 2006. The primary chilling of poultry carcasses—a review. *International Journal of Refrigeration* 29:847-862.
- Kim, A., Lee, Y.J., Kang, M.S., Kwag, S.I., & Cho, J.K., 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* 8:155-161.
- Lee, Y.J., Kim, H.J., Park, C.K., Kim, K.S., Bae, D.H., Kang, M.S., Cho, J.K., Kim, A.R., Kim, J.W., & Kim, B.H., 2007. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from an integrated broiler chicken operation in Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69:399-404.

- Lillard, H.S., 1990. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. *Journal of Food Protection* 53:202-207.
- Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., He, X., & Shi, X., 2011. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology* 144:511-518.
- Lopes, M., Galhardo, J.A., Oliveira, J.T., Tamanini, R., Sanches, S.F., & Muller, E.E., 2007. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina: Ciências Agrárias* 28:465-476.
- Nogrady, N., Kardos, G., Bistyak, A., Turcsanyi, I., Meszaros, J., Galantai, Z., Juhasz, A., Samu, P., Kaszanyitzky, J.E., Paszti, J., & Kiss, I., 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* *Infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 127:162-167.
- Olsen, J.E., Brown, D.J., Madsen, M., & Bisgaard, M., 2003. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of Applied Microbiology* 94:826-835.
- Rasschaert, G., Houf, K., & De Zutter, L., 2007. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology* 103:333-341.
- Rasschaert, G., Houf, K., Godard, C., Wildemauwe, C., Pastuszczak-Frak, M., & De Zutter, L., 2008. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. *Journal of Food Protection* 71:146-152.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., & Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:59-67.
- Rodrigues, A.C.A., Pinto, P.S.A., Vanetti, M.C.D., Bevilacqua, P.D., Pinto, M.S., & Nero, L.A., 2008. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. *Ciência Rural* 38:1948-1953.
- Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J., & Humphrey, T.J., 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 68:713-719.
- Steve Yan, S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P., & Foley, S.L., 2003. An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4:189-204.

- USDA/FSIS, 2014. Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges. , p. 19p. In: Service, U.S.D.o.A.F.S.a.I. (ed.).
- Von Rückert, D.A., Pinto, P.S., Santos, B.M., Moreira, M.A., & Rodrigues, A.C., 2009. Pontos críticos de controle de Salmonella spp. no abate de frangos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 61:326-330.
- Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X., & Zhou, G., 2013. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of Salmonella isolates from a chicken slaughter plant in China. Food Control 33:378-384.

Tabela 1. Número de amostras e procedimento de coletas em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne de frango em dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

Etapa	Amostra	Especificação	Código	Mt1	Mt2	Método de coleta de amostras
Recepção	Caixas	Caixas de Transporte	T	17	13	Swab <sup>1</sup>
Abate	Carcaça	Após depenagem	C1	27	24	Enxágue <sup>2</sup>
		Após evisceração	C2	28	24	Enxágue <sup>2</sup>
		Após pré-resfriamento	C3	25	24	Enxágue <sup>2</sup>
Processamento	Faca	-	F	11	7	Swab <sup>1</sup>
	Esteira	Esteiras de cortes	E	11	7	Swab <sup>1</sup>
	Mãos	Mãos dos funcionários	M	11	7	Swab <sup>1</sup>
Cortes	Coxa	-	C	11	2	Enxágue <sup>2</sup>
	Asa	-	A	12	2	Enxágue <sup>2</sup>
	Peito	-	P	12	2	Enxágue <sup>2</sup>
Total	-	-	-	165	112	-

<sup>1</sup> coleta em 400cm<sup>2</sup>

<sup>2</sup> USDA/FSIS, 2014

Tabela 2: Frequência de resultados positivos para *Salmonella* spp. obtidos de diferentes fontes de dois matadouros (Mt1 e Mt2) localizados em Minas Gerais, Brasil.

Etapa	Fonte	Mt1		Mt2		Estatística
		n	<i>Salmonella</i> spp.	n	<i>Salmonella</i> spp.	
Recepção	Caixa	17	7 <sup>a</sup>	13	1 <sup>a</sup>	$\chi^2$ : 4.22, GL: 1, p: 0.040
Abate	C1	27	26 <sup>b</sup>	24	0 <sup>a</sup>	$\chi^2$ : 131.3, GL: 5, p < 0.001*
	C2	28	26 <sup>b</sup>	24	1 <sup>a</sup>	
	C3	25	1 <sup>a</sup>	24	0 <sup>a</sup>	
Processamento	Esteira	11	0	7	1	$\chi^2$ : 1,66, GL: 1, p: 0,197
	Faca	11	1	7	0	$\chi^2$ : 0,67, GL: 1, p: 0,412
	Mão	11	0	7	0	-
Cortes	Peito	12	0	2	0	-
	Asa	12	3	2	0	$\chi^2$ : 0,64, GL: 1, p: 0,425
	Coxa	11	1	2	0	$\chi^2$ : 0.20, GL: 1, p: 0.657

n: número de amostras; X2: Qui-quadrado; GL: grau de liberdade; p:nível de significância (p<0,05); C1: após depenagem; C2: após evisceração; C3: após pré-resfriamento (chiller final). \* Obs: teste pareado por procedimento de Marascuilo (p < 0.05)

Obs: Na etapa de Recepção, letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os valores médios apresentados nas respectivas linhas. Na etapa de Abate, valores em uma mesma linha e/ou coluna com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística.

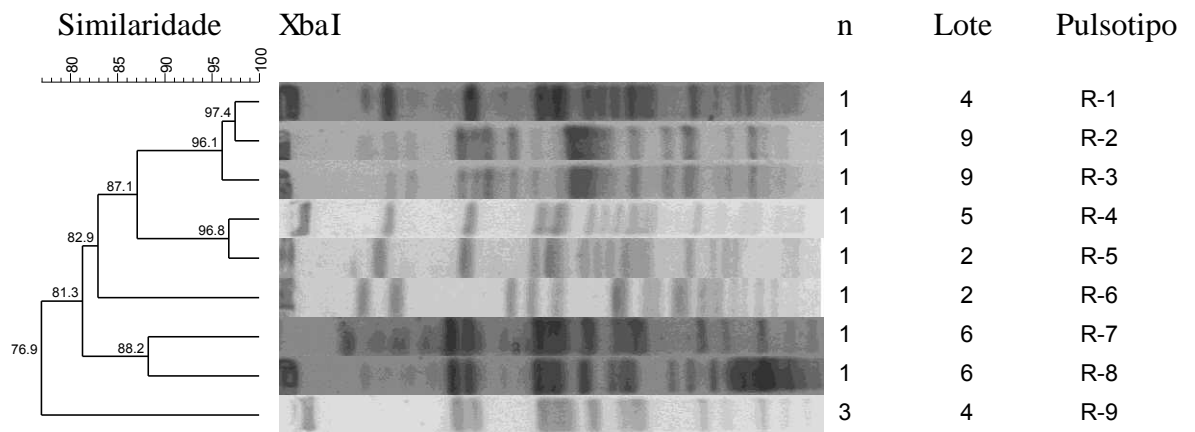


Figura 1: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA usando XbaI dos isolados de Salmonella spp. obtidos na etapa de recepção (caixas de transporte) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância).

n: número de isolados

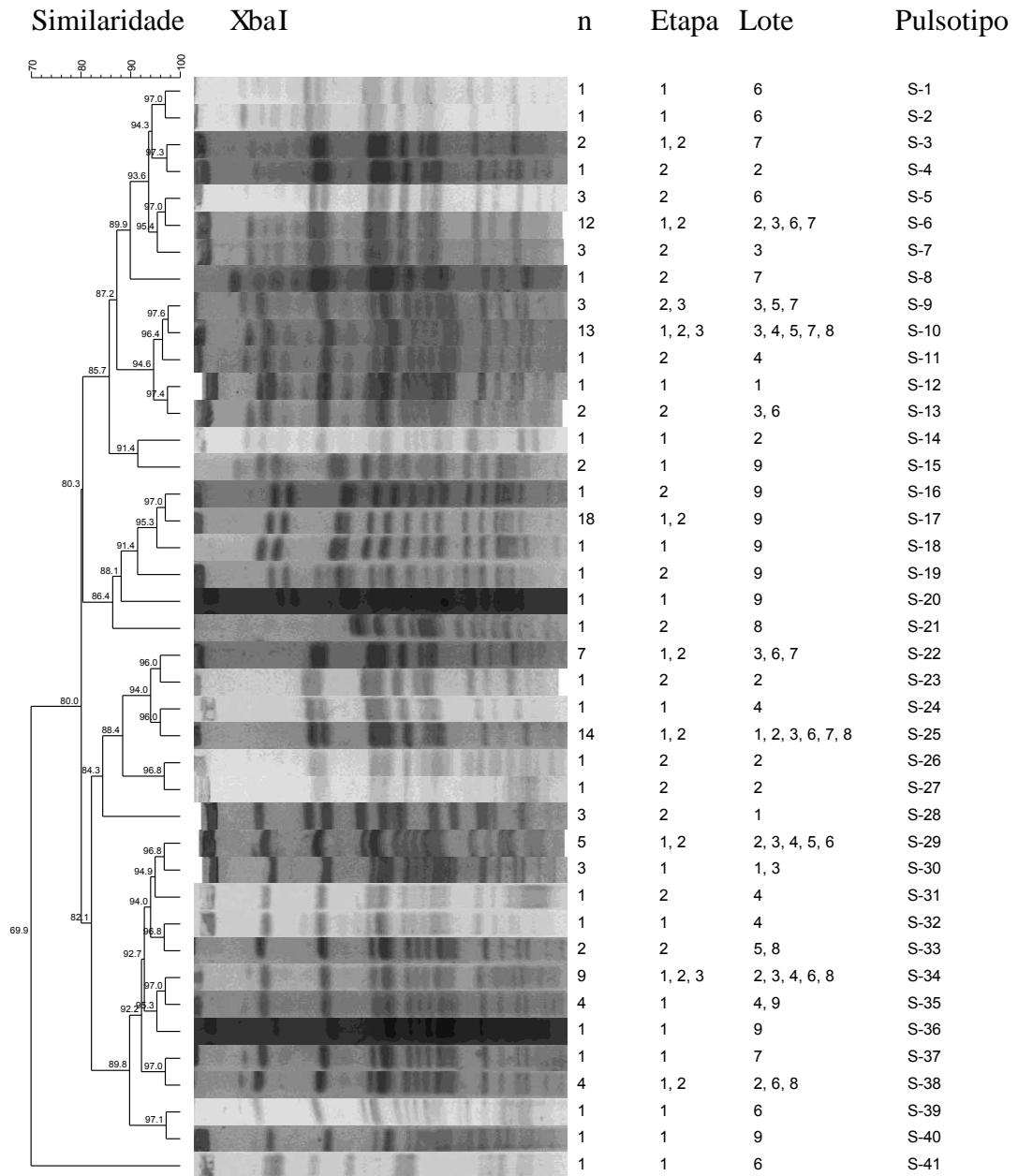


Figura 2: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA usando XbaI dos isolados de Salmonella spp. obtidos em diferentes etapas do abate (etapa 1: após depenagem, etapa 2: após evisceração, etapa 3: após pré-resfriamento-chiller final) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância).

n: número de isolados

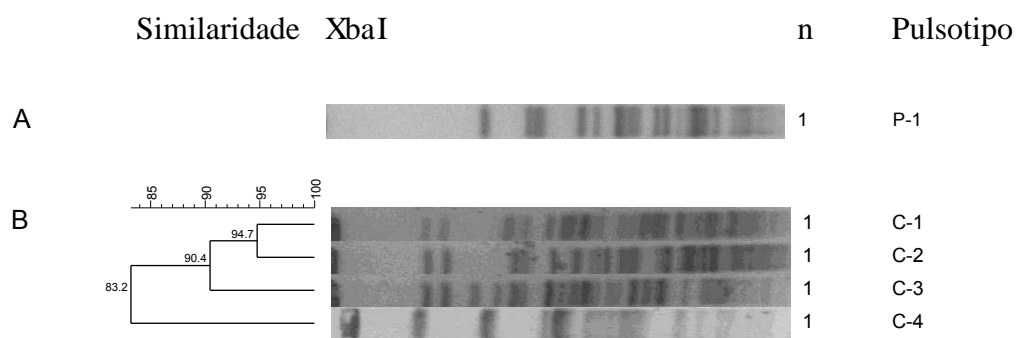


Figura 3: Representação esquemática dos perfis genéticos (pulsotipos) obtidos por PFGE após a macro-restrição do DNA, usando XbaI, dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos de ambiente de processamento (A, esteira) e cortes finais (B, asas) em matadouro de aves. Similaridades entre os pulsotipos foi estimada usando coeficiente de Dice (5% de tolerância).

n: número de isolados

## CONCLUSÕES

Com esse estudo foi possível avaliar a qualidade microbiológica de carcaças e cortes de frango e do ambiente de processamento em dois estabelecimentos industriais, evidenciando alto nível de contaminação por micro-organismos indicadores de higiene e *Salmonella* spp. nas etapas iniciais de abate, indicando que a contaminação intrínseca das aves é importante na introdução e disseminação de micro-organismos dentro do matadouro. Foi também observado, em ambos estabelecimentos, que a etapa de pré-resfriamento foi fundamental na redução da contaminação das carcaças tanto por micro-organismos indicadores quanto por patogênicos, indicando que atenção especial deve ser dada a essa etapa, que deve ser eficientemente controlada para garantir um produto final de qualidade microbiológica satisfatória. Os resultados de PFGE mostraram ainda uma diversidade genética entre os isolados obtidos e indicaram as possíveis rotas de contaminação dentro da cadeia produtiva da carne de frango, indicando uma contínua inclusão de novas cepas no ambiente de abate, bem como a persistência de isolados entre os animais obtidos de diferentes granjas.