

DIMITRI ALEKSANDER SALDANHA VON RÜCKERT

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MICROBIOLOGICO CONVENCIONAL,
IMUNOANÁLISE E REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) NO
MONITORAMENTO DE *Salmonella* sp. EM FRANGOS DURANTE O ABATE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R912c
2006

Rückert, Dimitri Aleksander Saldanha von, 1981-
Comparação dos métodos microbiológico convencional,
imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no
monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o
abate / Dimitri Aleksander Saldanha Von Rückert.
– Viçosa : UFV, 2006.
vii, 62f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paulo Sérgio de Arruda.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 54-62.

1. Imunologia veterinária. 2. Bacteriologia veterinária.
3. Salmonella. 4. Reação em cadeia de polimerase.
5. Alimentos - Contaminação. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

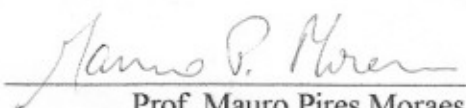
CDD 22.ed. 636.0896079

DIMITRI ALEKSANDER SALDANHA VON RUCKERT

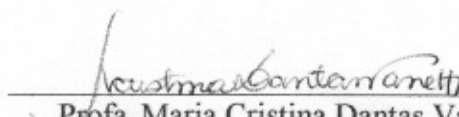
**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICO
CONVENCIONAL, IMUNOANÁLISE E REAÇÃO DA POLIMERASE
EM CADEIA (PCR) NO MONITORAMENTO DE *Salmonella* sp. EM
FRANGOS DURANTE O ABATE**

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".

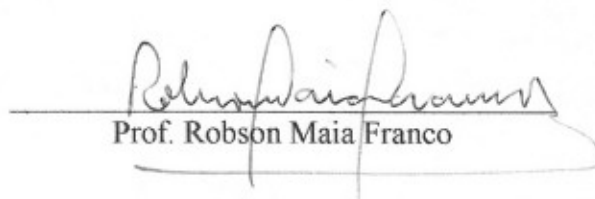
APROVADA: 27 de julho de 2006



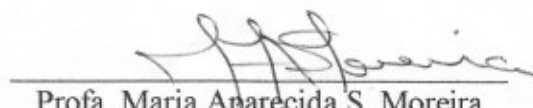
Prof. Mauro Pires Moraes
(Co-orientador)



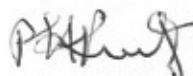
Prof. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Co-orientador)



Prof. Robson Maia Franco



Prof. Maria Aparecida S. Moreira



Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

São tantos à agradecer, que se torna impossível falar de todos.

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária por terem me propiciado uma excelente graduação, pelo bom suporte físico e material colocado à disposição para a execução dos experimentos e ao excelente corpo docente, que me auxiliou em tudo o que precisei.

Gostaria de agradecer a empresa BIOLAB-MÉRIEUX S. A. pela doação do Kit VIDAS[®].

Aos meus pais, Ernesto e Neirimar, pela excelente educação proporcionada e pelos sólidos valores morais passados.

À minha namorada, Daiane, meu pilar, que desde o início me apoiou, e que agora mesmo estando fora, me dá forças, confiança e motivação.

Ao Professor Paulo pela compreensão, confiança, paciência e liberdade proporcionada para a execução dos trabalhos.

Ao colega Augusto César pelos “galhos quebrados”, pela coleta das amostras e pelo auxílio da execução das técnicas microbiológicas.

À professora Bernadete pelos conselhos, idéias e coisas mais.

À professora Maria Cristina pelos conhecimentos e orientações passadas, pelas boas idéias e por auxiliar na utilização do sistema VIDAS[®] no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Ao meu colega Abelardo, meu mentor nas reações de PCR, pela ajuda, pelos ensinamentos, dicas e companheirismo.

À professora Márcia pela confiança e por ceder o Laboratório de Virologia Animal para que fossem executadas as técnicas de PCR.

À todos os estudantes, colegas e funcionários pelo auxílio e amizade.

Finalmente, agradeço a DEUS por todas as experiências boas, que me proporcionaram satisfações e por todas as experiências ruins, que me proporcionaram lições.

*A felicidade na vida, não está no destino,
mas no percurso, que é longo e sinuoso
Aquele que nunca errou na vida, não é o sábio,
o sábio é aquele que em cada derrota e em cada percalço,
aprende e encontra motivos para se superar e melhorar ainda mais
Os desafios sempre existiram e existirão,
mas quem os classifica ou rotula, somos nós...*

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1- <i>Salmonella</i> sp.	3
2.2-Abate e Processamento de Frangos	10
2.3-Métodos microbiológicos convencionais	14
2.4-Detecção de <i>Salmonella</i> sp. por Imunoanálise	17
2.5-Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	19
2.6-Sistema APPCC	24
3-MATERIAL E MÉTODOS	
3.1-Amostragem e delineamento experimental	31
3.2-Ensaio Laboratoriais	33
3.3-Análise Estatística	36
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5- CONCLUSÃO	47
ANEXO	48
BIBLIOGRAFIA	54

RESUMO

VON RÜCKERT, Dimitri Aleksander Saldanha, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate.** Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Mauro Pires Moraes.

Foram avaliados neste estudo os métodos convencional, imunoanalítico e por reação de polimerase em cadeia – PCR para a pesquisa de *Salmonella* sp. em, respectivamente, 135, 70 e 90 amostras de carcaças de frangos, distribuídas em cinco diferentes etapas de abate em um abatedouro. Procedeu-se a comparação da frequência de detecção de *Salmonella* sp. das carcaças nas diferentes etapas de abate, e da eficiência de detecção dos três métodos, visando a indicação de método alternativo para o monitoramento no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os resultados foram comparados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), obtendo um valor 18,51 ($p \leq 0,01$) na análise conjunta dos três métodos avaliados. Tais métodos também foram comparados, dois à dois, para a quantificação das chances de detecção de cada um pela Razão de Chances ou “Odds Ratio” (OR). Obteve-se um $\chi^2 = 8,72$ ($p \leq 0,01$), comparando-se os resultados positivos obtidos pelo sistema imunoanalítico com os do método microbiológico convencional, sendo a OR igual a 3,34 e Intervalo de Confiança (IC) entre 1,36 e 8,32. Também houve diferença estatística com um χ^2 de 18,37 ($p \leq 0,01$) entre os resultados positivos totais da PCR e do método microbiológico convencional, sendo a OR igual a 4,83 (IC: 2,13 - 11,15). O mesmo não ocorreu entre os métodos PCR e imunoanalítico. Estes dois, quando comparados com a microbiologia convencional, foram considerados mais eficientes e adequados para a utilização em monitoramento no APPCC. A etapa de abate localizada após o pré-resfriamento (ponto E) foi considerada a mais adequada como ponto crítico de controle por apresentar a menor contaminação e por assumir uma posição estratégica no final da linha de abate.

ABSTRACT

VON RÜCKERT, Dimitri Aleksander Saldanha, M.S., Universidade Federal de Viçosa, july, 2006. **Comparison of the standard microbiological method, immuno-analysis and polymerase chain reaction (PCR) for monitoring *Salmonella* sp. in chicken during the slaughter.** Advisor: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Mauro Pires Moraes.

In this study, the standard microbiological method, immuno-analysis and polymerase chain reaction - PCR were evaluated using, respectively, 135, 70 and 90 carcass samples, distributed into five different slaughter stages of a poultry slaughterhouse. The comparison of the *Salmonella* sp. contamination frequency among the different slaughter stages and the comparison of the detection efficiency among the three methods were evaluated, considering the possible use as a monitoring tool for the Hazard Analysis and Critical control Points program (HACCP). The whole three methods were compared by the Qui-Squared test (χ^2), obtaining a value of 18.51 ($p \leq 0.01$). These methods also were compared two by two, to quantify the Odds Ratio (OR). Was obtained a $\chi^2 = 8.72$ ($p \leq 0.01$), when were compared the positive results of the immuno-analysis and the Standard Microbiological ones; and the OR calculated was 3.34 (IC: 1.36 – 8.32). When comparing the positive results of PCR and the standard microbiological ones, were obtained χ^2 of 18.37 ($p \leq 0.01$) and OR = 4.83 (IC: 2.13 – 11.15). The same didn't happen when comparing the PCR and immuno-analysis methods. These, comparing to the standard microbiological technique, were considered more efficient e suitable methods for utilization as monitoring tools for HACCP. The slaughter stage localized after the chiller (Point E) shows itself as the most suitable as a critical control point, because it was less contaminated and takes over a strategic position at the end of the slaughter line.

1-INTRODUÇÃO

Salmonella sp. é considerada por alguns pesquisadores no mundo como uma das bactérias mais importantes envolvidas em contaminações de alimentos à base de frango, sendo também o frango uma das mais importantes fontes deste microrganismo.

Esta bactéria é de fundamental importância em saúde pública pelo fato de ser patogênica ao ser humano e de representar um dos principais parâmetros de determinação dos padrões microbiológicos, de reconhecimento mundial, para alimentos.

A demanda por testes de pesquisa de *Salmonella* sp. em aves vem aumentando, sobretudo por aqueles mais rápidos, econômicos e eficientes; tudo isso com o objetivo de atender as exigências recentes em controle de qualidade e pressões do mercado, que se apresenta cada vez mais ávido por volume de produção e por qualidade. Desta forma, a segurança e a satisfação, tanto do consumidor final quanto dos demais elos da cadeia produtiva da carne de frango, são alcançados.

É interessante ressaltar que, conforme a ABEF (2006), o Brasil produziu, em 2005, 9,2 milhões de toneladas de carne de frango, qualificando-o como o terceiro maior produtor mundial, só perdendo para os EUA e a China. Neste mesmo ano, as exportações do país superaram as norte-americanas e atualmente, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango. O país exportou nada menos que 2,9 milhões de toneladas do produto, superando os 2,5 milhões dos EUA. Segundo o AVISITE (2006), neste ano, a exportação gerou uma arrecadação de aproximadamente 3,5 milhões de dólares. Complementando este panorama, o Brasil possui um grande mercado consumidor, composto por aproximadamente, 180 milhões de habitantes e que representa um consumo per capita de aproximadamente, 40,9 kg (UBA, 2006).

Este grande mercado consumidor exige alto padrão de qualidade e segurança dos produtos fornecidos. Para tanto, programas e ferramentas de controle de qualidade desenvolvidos para atingir tais objetivos têm despertado o interesse de pesquisadores.

No controle da qualidade no abate das aves, a implantação de programas como o de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 1998a), o de Boas Práticas de Fabricação (BPF ou GMP) (BRASIL, 1997) e o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003b) têm sido uma necessidade e exigência das autoridades governamentais. O Programa de Redução de Patógenos está sendo implementado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, abrangendo a análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura*, para a pesquisa de *Salmonella* sp., envolvendo os estabelecimentos de abate de aves registrados no Serviço de Inspeção Federal - SIF. O programa faz vinculações com os avanços tecnológicos e com os resultados obtidos pelo monitoramento, sendo, portanto, factível de alterações, a critério do DIPOA.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram o de comparar os métodos microbiológico convencional e rápidos, na detecção de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate, visando a indicação de possíveis ferramentas para o monitoramento de *Salmonella* sp. no programa de qualidade APPCC; avaliar diferentes etapas do processo de abate quanto a presença da bactéria e determinar os possíveis pontos críticos de controle.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-*Salmonella* sp.

As salmonelas são pequenos bastonetes Gram-negativos, não-esporulados anaeróbios facultativos, lactose, uréase e oxidase negativas, e medem de 0,7 a 1,5 µm por 2,5 a 5,0 µm. A bactéria pertence à família Enterobacteriaceae, sendo a maioria dos sorotipos móvel devido à presença de flagelos peritríquios. O pH de crescimento varia entre 4 e 9, sendo um ótimo de 7, a faixa de temperatura de crescimento está entre 7 e 47 °C, com ótimo entre 35 e 37 °C, e atividade de água mínima para crescimento é de 0,94. Produzem gás a partir da fermentação da glicose e ácido sulfídrico, são capazes de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitratos a nitritos e utilizar citrato como fonte de carbono. São bactérias indistinguíveis da *Escherichia coli* pelo microscópio óptico ou por meio de cultivo em ágar nutriente (BERGEY, 1984).

O gênero *Salmonella* foi nomeado como tal em 1885 pelo Médico Veterinário e patologista, Salmon (YAN et al., 2003).

A identificação do microrganismo ao nível do gênero não é difícil pelo fato de que seus integrantes compartilham certas características bioquímicas comuns e apresentam um alto nível de similaridade genética. A classificação desta bactéria evoluiu ao longo do tempo. Historicamente, sua classificação era baseada pela epidemiologia, gama de hospedeiros, manifestações clínicas, reações bioquímicas e padrões antigênicos de superfície. A nomenclatura se tornou muito confusa, parcialmente em decorrência das designações de espécies e sorotipos serem

intercambiáveis. Nos anos 70 do último século, análises moleculares demonstraram que todos os integrantes do gênero eram de 85 a 100 % geneticamente correlacionados, o que difere completamente do que ocorre em outros gêneros da família Enterobacteriaceae. Por causa dessa íntima relação genética, uma espécie única, a *Salmonella cholerasuis*, foi proposta. Entretanto, o nome da espécie causou confusão uma vez que *cholerasuis* era usada tanto como nome de espécie quanto designação de sorotipo. Além disso, o sorotipo Cholerasuis não é representativo da maioria dos sorotipos. Em 1999 foi discutida a implementação das idéias de Le Minor e colaboradores, que haviam sugerido o uso de *S. enterica* para substituir *S. cholerasuis* como única espécie. Baseados em propriedades de hibridização de DNA, esta proposta reconhece as espécies *S. enterica* subsp. *enterica*; *S. enterica* subsp. *salamae*; *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae*; *S. enterica* subsp. *houtenae*; *S. enterica* subsp. *bongor* e *S. enterica* subsp. *indica*. Esta proposta até agora ainda não foi aceita pela Comissão Judicial do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática, entretanto, tem sido amplamente utilizada pelo Centro de Referência e Pesquisa de *Salmonella* da Organização Mundial da Saúde, localizado no Instituto Pasteur em Paris e pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) em Atlanta, EUA (YAN et al., 2003).

A proposta de POPOFF et al. (1998), tem sido aceita por parte da comunidade científica e classifica o gênero *Salmonella* em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A primeira possui 21 sorotipos que são usualmente isolados de animais de sangue frio do ambiente, mas raramente de mamíferos, incluindo o homem. A segunda espécie contém seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, and *S. enterica* subsp. *indica*. *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são atualmente agrupadas dentro da subespécie *enterica* (CASTILLA, 2003). A classificação em subespécies é primariamente baseada em hibridizações de DNA cromossomal (YAN et al., 2003).

Já houve propostas de se agrupar *E. coli* e *Salmonella* sp. em um único gênero dadas as semelhanças de, aproximadamente, 90% de homologia DNA-DNA (YAN et al., 2003). Acredita-se que ambas as bactérias surgiram de um ancestral comum (JAY, 2005).

Muitos microbiologistas concordam com a opção de nomenclatura que divide o gênero em três espécies: *Salmonella typhi* (causadora da febre tifóide); *Salmonella choleraesuis* (patógeno primário de suínos e que ocasionalmente causa infecções sistêmicas em humanos) e *Salmonella enteritidis* (causadora de infecções diarreicas em

humanos e animais), destacando que está possui mais de 2.000 sorotipos (YAN et al., 2003).

Taxonomicamente, a classificação proposta por POPOFF e LE MINOR (1997) consiste de: gênero, espécie, subespécie e sorotipo. Como exemplo, pode se citar a grafia do sorotipo Enteritidis, como: *S. enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis. Contudo, comumente utiliza-se a designação de gênero e sorotipo, abreviando, portanto, para *S. Enteritidis* (CASTILLA, 2003). Podem-se citar outros exemplos como o caso da *S. enteritidis* sorotipo Typhimurium, que na maioria das vezes é referida apenas como *S. Typhimurium*. Da mesma forma, outros sorotipos de *S. enteritidis* são frequentemente designadas como se fossem espécies ao invés de sorotipos da *S. enteritidis* (SALYERS & WHITT, 1994).

A identificação da espécie ou sorotipo de *Salmonella* é realizada por meio de métodos de perfil bioquímico e sorológico, resistência a antimicrobianos, produção ou sensibilidade a bacteriocinas, fagotipagem, perfil plasmidial e de restrição a endonucleases (DOYLE, 1990). A sorotipagem é baseada nas características dos antígenos somáticos (O), que define o sorogrupo; flagelares (H), que define o sorotipo e capsulares (K); consistindo na base de classificação das *Salmonella* sp. Quando a classificação é feita pelo uso dos padrões antigênicos; espécies e sorotipos são classificados em grupos designados A, B, C, e assim por diante, de acordo com similaridades de um ou mais antígenos “O” (YAN et al., 2003).

A importância clínica deste microrganismo foi reconhecida muito tempo antes dos modernos métodos de especificação baseados em homologia de DNA (SALYERS & WHITT, 1994). O gênero *Salmonella* é considerado um dos mais importantes envolvidos em doenças relacionadas ao consumo de alimentos (HOGUE et al., 1998; WHO, 2002). Segundo JAY (2005), todos os integrantes do gênero *Salmonella* são considerados patogênicos para humanos.

Dados epidemiológicos sobre infecções em humanos por *Salmonella* sp. nos vários países são diversificados. De uma forma geral, percebe-se grande número de notificações em países altamente desenvolvidos e poucas notificações em países mais pobres. Tal fato é em decorrência de possíveis diferenças na eficiência dos órgãos oficiais de saúde de cada país na notificação das enfermidades alimentares.

A prevalência de salmoneloses aumentou significativamente durante as décadas de 80 e 90, em todo o mundo. Geralmente, os humanos são infectados por salmonela através de água e alimentos contaminados, podendo ocorrer transmissão também via

contato direto com animais afetados, sendo aves e bovinos indicados como as principais origens da bactéria (KWANG et al., 1996).

A susceptibilidade do homem à salmonela é dependente de fatores como a dose infectante, estado imune e idade do hospedeiro, entre outros fatores. Em indivíduos saudáveis, a doença não é considerada grave, porém, em indivíduos imunocomprometidos como aqueles com AIDS, em tratamento quimioterápico, crianças e idosos, a doença pode evoluir para caso grave, podendo levar a morte (MILDVAN et al., 1982; GRUENEWALD et al., 1994). Nestes casos, a enfermidade pode evoluir para septicemia e causar várias seqüelas como pericardite, doenças neurológicas e neuromusculares, artrites, espondilites e osteomielites (POPPE, 1999).

Salmonelas são normalmente patogênicas para os seres humanos ou para os animais quando ingeridas por via oral, possuindo um período de incubação médio de 12 a 36 horas. Essas bactérias são transmitidas de animais e produtos de animais para os seres humanos, onde provocam enterite, infecção sistêmica e febre entérica (BROOKS et al., 1998).

As infecções humanas são frequentemente associadas ao consumo de carne de frango e ovos, crus ou mal cozidos (DUGUID & NORTH, 1991; BICHLER et al, 1994; SCHIMID & BAUMGARTNER, 1999; SCUDERI, 1999; THIEL, 1999). A contaminação de carne crua de frango com *Salmonella* sp. não é usualmente considerada um risco ao consumidor, uma vez que este alimento é próprio para o consumo após cocção. O verdadeiro problema reside no contato de um alimento pronto para o consumo (cozido) com um alimento cru, levando à contaminação cruzada (CAPITA et al., 2003). Os casos mais freqüentes de infecção por *Salmonella* sp reportados em humanos foram em decorrência do manuseio de carne de frango crua e produtos crus, junto com o consumo de carne de frango mal cozida (PANISELLO et al., 2000).

Estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza, com humanos e animais sendo seus reservatórios primários. Por ser uma enterobactéria, o habitat primário de *Salmonella* sp. é o trato intestinal de animais como pássaros, répteis, animais de criação, humanos e ocasionalmente insetos. A bactéria também pode ser encontrada em outras partes do corpo de tempos em tempos (JAY, 2005).

Epidemiologicamente, alguns sorotipos estão associados com maior freqüência ou mais adaptados a determinados hospedeiros. Cita-se *S. Cholerasuis*, que causa septicemia, pneumonia e enterocolite em suínos; *S. Dublin*, enterite mucohemorrágica, septicemia, pneumonia e aborto em bovinos; *S. Abortusequi*, aborto em eqüinos; *S.*

Abortusovis, aborto em ovinos; *S. Gallinarum*, febre tifóide em galinhas e *S. Pullorum*, pulorose em galinhas e perus. Os sorotipos adaptados ao homem incluem *S. Typhi* que causa febre tifóide e *S. Paratyphi*, agente causador da febre paratifóide. A *S. enteritidis* faz parte dos mais de 2.000 sorotipos de salmonelas que não são adaptadas a hospedeiros específicos (paratíficas), e que causam salmonelose em humanos e em ampla variedade de animais (POPPE, 1999).

As aves comerciais constituem um dos mais importantes reservatórios de salmonelas e são responsáveis pela introdução da mesma na alimentação humana, através da contaminação da carne e dos ovos, principalmente por *S. enteritidis* (GAST, 1997).

Nas granjas, a bactéria é introduzida através de rações contaminadas por matérias primas de origem animal, como farinha de carne, ossos, peixe penas e vísceras (HOFER et al., 1998). O patógeno também pode ser introduzido pela água, contato com aves ou outros animais portadores, insetos, roedores, pessoas e equipamentos (BORLAND, 1975; GAST, 1998).

Durante o abate e processamento dos frangos, a presença de *Salmonella* sp., no intestino, pele e penas das aves, resulta em contaminação da carne e seus subprodutos (BRYAN & DOYLE, 1995). A contaminação cruzada pode ocorrer principalmente em mercados e em cozinhas industriais e a refrigeração imprópria do produto leva a bactéria a multiplicar-se rapidamente (DUGUID & NORTH, 1991).

A *Salmonella* sp. invade as células dos mamíferos no trato intestinal por meio da indução de rearranjos de actina do enterócito, o que resulta na formação de pseudópodes que engolfam a bactéria ocasionando a gastroenterite cujos sintomas resultam, provavelmente, da invasão das células da mucosa. A *S. typhi* causa infecção sistêmica, enquanto *S. Typhimurium* raramente penetra além dos tecidos submucosos (FORSYTHE, 2002). A dose infecciosa mínima de *Salmonella* sp. para o homem varia de 10 a milhões de células e está relacionada com fatores inerentes ao indivíduo, ao sorotipo da *Salmonella* e ao tipo de alimento contaminado (VANETTI, 2003).

Os sorotipos de *S. enterica* compõem os principais agentes responsáveis por surtos de gastroenterite humana. Entre as diferentes espécies, os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são de grande importância clínica. Produtos de frango têm sido freqüentemente envolvidos como fonte de sorotipos de *S. enterica* (COHEN et al., 1994; NGUYEN et al., 1994).

Segundo LEON-VELARDEA et al. (2004), *S. enterica* sorotipo Typhimurium é uma causa comum de salmoneloses entre humanos e animais em muitos países. *S.*

Typhimurium é responsável por 40 a 70 % dos casos de salmoneloses humanas, apresentando como principais sintomas a diarreia, febre, dor de cabeça, náusea, dor abdominal, vômito e, menos frequentemente, sangue nas fezes. As infecções em humanos geralmente ocorrem pelo consumo de alimentos contaminados de origem vegetal ou animal. *S. Typhimurium* DT 104 e outros fagotipos relacionados têm, desde 1990, emergido como problemas mundiais de saúde associados ao consumo de alimentos de origem animal. Este fagotipo é largamente reconhecido com um patógeno virulento e tem sido isolado com cada vez mais frequência. Além disso, este fagotipo provoca também infecções em uma ampla variedade de animais como gado, frangos, perus, ovelhas, cavalos e cabras.

Segundo LANDERAS et al. (1998) a *S. Enteritidis* é atualmente a maior causa de salmonelose humana na maioria dos países industrializados. O sorotipo *Enteritidis* é zoonótico e tem como principal reservatório as aves de produção, abrangendo desde ovos à carne destas aves. Três fatos desempenham um papel importante na dispersão e emergência desse sorotipo: (1) o aumento da intensidade na produção de frangos e ovos; (2) o aumento no fornecimento de alimentos para grande número de pessoas como os “fast foods” e restaurantes coletivos; (3) o rápido crescimento no comércio internacional de alimentos entre países com condições diferentes de higiene na produção de alimentos tanto para humanos quanto para animais (D’Aoust, 1994). Outro problema adicional é a difusão do sorotipo *Enteritidis* no ambiente via fezes de humanos e animais, assim como pelo destino do esgoto.

Nos Estados Unidos são estimados 1,5 milhão de novos casos de salmoneloses não tifoidais por ano (ANGULO et al., 1998; MEAD et al., 1999). Segundo TAKAHASHI et al. 2004, as infecções por *Salmonella* lideram os casos de surtos bacterianos de origem alimentar nos Estados Unidos.

Na Inglaterra e País de Gales, a carne de frango foi origem de surtos e casos esporádicos (RAMPLING et al., 1989) e por aproximadamente, 30.000 casos/ano de infecção alimentar por *Salmonella* sp. em seres humanos (WARD & THRELFALL, 1997). De janeiro de 1992 a 31 de dezembro de 1994, o Centro de Vigilância e Notificação de Doenças (CDSC) identificou 1.594 surtos de infecções intestinais na Inglaterra e País de Gales; sendo que dos 282 surtos que ocorreram em residências, 17% foram causados por *Salmonella* sp., sendo a *S. Enteritidis* a principal responsável (71%) (RYAN et al, 1997).

MOORE et al. (2003) relataram um surto de gastroenterite causada por *S. Bredney*, envolvendo dez pessoas no Norte da Irlanda, associado ao consumo de frango cozido contaminado.

Na Itália, de 1991 a 1994, dos 1.699 surtos de origem alimentar, a salmonela foi responsável por 81%, dos quais 34% foram *S. Enteritidis* (SCUDERI et al., 1996).

Diferenças nas taxas de contaminação por *Salmonella* sp. quando se comparam carcaças inteiras de frango com cortes de frango é muito controvertida. As taxas de contaminação de carcaças (55 %) foram maiores que dos cortes de frango (40 %), segundo SHACKELFORD (1988). Os achados de PLUMMER et al. (1995) também confirmam contaminações maiores em carcaças inteiras quando comparado com cortes de frango, como asas e coxas. Entretanto, pesquisadores como UYTENDAELE et al. (1998) encontraram contaminações maiores por *Salmonella* sp. em cortes de frango. Estes autores sugeriram a importância da contaminação cruzada, durante o preparo e manipulação desses produtos.

Segundo CAPITA et al. (2003), o gênero *Salmonella* foi detectado em 49% das amostras de produtos de frango obtidos de supermercados da Espanha. Nessa pesquisa, a incidência de 40% de *Salmonella* sp. em produtos processados de frango foi a mesma da achada em cortes de frango, ou seja, menor que a contaminação de carcaças inteiras. Mesmo assim, a produção de produtos como salsichas e hambúrgueres requerem bastante manipulação, aumentando assim, o risco de contaminação cruzada. Contudo, isto é atenuado em virtude da utilização dos vários temperos, pimentas e ervas que possuem atividade antimicrobiana (JAY, 2005). O autor destaca ainda os sorotipos das *Salmonella* que foram encontradas nos produtos: *S. Enteritidis*, *S. Poona*, *S. Paratyphi B* e *S. Worthington*.

Na Albânia, um total de 31 salmonelas, pertencentes a quatro sorogrupos diferentes e nove sorotipos foram isoladas de 30 das 461 (6,5 %) amostras de carne de frango. O sorotipo mais encontrado foi *S. Enteritidis*, isolada em 16 das 30 amostras positivas para salmonela (53,3 %). Os outros sorotipos isolados foram *S. Senftenberg* (três isolados), *S. Newport* (dois isolados) e *S. Abony*, *S. Agona*, *S. Banana*, *S. Brancaster*, *S. Infantis* e *S. Oslo*, com apenas um isolado cada (BELI et al., 2001).

RODRIGUE et al. (1990) detectaram um aumento das infecções por *Salmonella* sp. da década de 80 no último século, o que poderia estar relacionado ao consumo de ovos e subprodutos contaminados por *S. Enteritidis*. Todavia, a presença de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos não pode ser ignorada (RAMPLING et al., 1989; BOER & ZEE, 1992; GIESSEN et al., 1992; POPPE, 1994; SCUDERI et al., 1996; COSTA, 1996; SAKAI & CHALERMCHAIKIT, 1996; WARD & THRELFALL, 1997).

Os dados oficiais que indicam a ocorrência de sorotipos de *Salmonella* no Brasil são exíguos, tanto em relação às situações clínicas, quanto às epidemiológicas (HOFER

et al., 1997). Contudo alguns dados podem ser encontrados. TAVECHIO et al. (1996) reportaram um aumento do isolamento de *S. Enteritidis* a partir de 1993. Em São Paulo, no período de 1950 a 1990, um total de 45.862 isolados de *Salmonella* sp. foram identificados, sendo 31.517 de infecções humanas e 14.345 de material não humano (TAUNAY et al., 1996).

2.2-Abate e Processamento de Frangos

O abate de frangos no Brasil é regulamentado pela Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998b) e pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1980). A seguir, são mencionadas algumas das respectivas normas e outras recomendações técnicas para o abate de frangos.

Segundo COTTA (2003), um abatedouro moderno de frangos é um conjunto de instalações dotadas de equipamentos de tecnologia avançada. O processamento pode ser tanto automático ou semi-automático, quanto manual. Geralmente a capacidade máxima de abate é de cerca de 5.000 aves/hora.

Quando o veículo carregado de aves chega ao pátio do abatedouro, as aves permanecem em repouso durante duas horas até o abate. Neste período, o serviço de inspeção veterinária examina o estado *ante-mortem* das aves. A espera se faz numa instalação tipo hangar, dotada de potentes ventiladores de teto para garantir uma circulação correta de ar entre as caixas de aves. Estas são retiradas das caixas, individual e manualmente, e penduradas pelos pés nos ganchos da trilhagem móvel de abate, conhecida como nória. Com a progressão desta linha, as aves são obrigadas a mergulhar a cabeça em tanque contendo água sob corrente elétrica, desta forma, cada ave é insensibilizada, facilitando a operação seguinte, a sangria. A insensibilização tem sido justificada pelo fato de permitir um tratamento menos cruel ao animal e reduzir a ocorrência de fraturas, pois a ave fica imobilizada. Nestas condições a sangria fica otimizada. O choque elétrico, aplicado por cerca de sete segundos deve apenas causar insensibilização momentânea, ao mesmo tempo, causa elevação da pressão arterial, o que também facilita a perda de sangue. Também ocorre vasoconstrição periférica, que evita as hemorragias subcutâneas, capazes de depreciar a qualidade da carcaça. Quando

as aves são destinadas a mercados específicos, o abate pode ocorrer sem insensibilização.

A sangria pode ser realizada manual ou mecanicamente e consiste na secção das veias jugulares e artérias carótidas, podendo ser obtido por um corte dentro da cavidade bucal ou por um corte profundo no pescoço. O sangue é escoado por um tempo de 90 segundos a, no máximo, três minutos, sendo este, recolhido para posterior processamento e produção de farinha de sangue e vísceras.

Após a sangria as aves vão para o escaldamento em água quente, onde ficam imersas por cerca de três minutos. A respiração da ave deverá ter cessado por completo, impossibilitando a aspiração de água pelos pulmões. A temperatura da água pode ser de 50 °C, quando o produto for destinado à comercialização apenas resfriado, pois neste caso a aparência é muito importante e a depenagem é mais lenta e onerosa. Quando a ave é destinada ao congelamento, emprega-se a temperatura de 60 °C, que torna a retirada de penas mais fácil, aumentando o rendimento e velocidade da linha, mas a pele pode sofrer dilacerações e despigmentação. Isto adquire importância menor no produto congelado uma vez que este é embalado em embalagem opaca, ao contrário do produto resfriado. A água do escaldador deve permanecer em agitação ou borbulhamento pela injeção de ar de baixo para cima, permitindo assim, que a água penetre entre as penas até a pele da ave. O tempo de imersão é de cerca de dois minutos.

Seguindo a linha de abate, as aves vão para a depenagem, executada por uma depenadeira automática, equipamento dotado de cilindros munidos de dedos rugosos e flexíveis de borracha, que giram sobre as penas, que são removidas e recolhidas para posterior processamento (farinha de penas). As aves depenadas caem numa mesa de aço inoxidável por onde passam por um exame de controle de qualidade. Este é o fim da área chamada “suja” da linha de abate.

O frango, ao sair da área suja, é pendurado em outra linha, independente da anterior e é conduzido para a área “limpa” do abate, onde ocorrerá a secção dos pés e as operações de evisceração. Antes da evisceração, ocorre a secção do pescoço e desprendimento do papo, faz-se também uma incisão na região da cloaca, seguindo sua retirada. Deve-se atentar para não ocorrer perfuração intestinal, evitando assim, contaminação da carcaça. A seguir, é feita a eventração - exposição dos órgãos da cavidade abdominal. Os técnicos do serviço de inspeção veterinária inspecionam as vísceras, eliminando total ou parcialmente as partes que apresentarem irregularidades. O coração e a moela são retirados para processamento à parte. Em seguida a carcaça deve

ser esvaziada de todos os seus órgãos internos, como pulmões e rins, e é executada a lavagem final com ducha.

Os miúdos como coração, moela e fígado, podem ser usados para a fabricação de produtos enlatados, ou comercializados *in natura*. O fígado não deve ser congelado, pois torna-se muito friável após descongelamento. As vísceras não comestíveis são destinadas à secção de graxaria, para serem adicionadas aos produtos que serão transformados em farinha de carne.

A próxima etapa é o pré-resfriamento, meio eficiente de reduzir rápida e economicamente a temperatura da carcaça, e é feito pela imersão desta em água gelada. O frango vivo, ao ser pendurado na nória, possui uma temperatura corporal em torno de 40 °C. Após a ducha que segue à inspeção, a temperatura cai para cerca de 30 °C, ainda muito alta para um produto tão perecível. O pré-resfriamento consiste na imersão das carcaças por 20 a 30 minutos, numa mistura de água e gelo em um equipamento retangular, de aço inoxidável, e com um sistema de rosca sem fim interno, que conduz as aves de uma extremidade à outra, conhecido como resfriador ou “chiller”. Alguns abatedouros utilizam dois resfriadores. Existem vários modelos desses equipamentos no mercado, mas qualquer que seja, deve permitir a queda da temperatura das aves para 4 °C quando da sua saída. Seguindo a linha, as carcaças são colocadas sobre peneiras ou trilhos, para que sofram o gotejamento, perdendo o excesso de água superficial. Isto é importante, pois a água depositada no fundo das embalagens plásticas causa prejuízos econômicos por comprometimento da aparência do produto.

Após a classificação por peso, as carcaças são devidamente embaladas individualmente e acondicionadas em caixas de papelão ou sacos plásticos com cerca de 12 carcaças e são conduzidas à câmara de congelamento a -30 °C, onde permanecem até a temperatura no interior do peito atingir -18 °C. A legislação prevê o seu consumo em no máximo um ano. A carcaça a ser comercializada resfriada, deve ser mantida a 4 °C, sendo o prazo de vida comercial de, no máximo, sete dias.

As mudanças de hábito do consumidor acabaram por desenvolver a comercialização de produtos mais acabados e processados. Podem ser encontrados no varejo um grande número de produtos como cortes de frango congelados, filés, hamburques embutidos, salsichas, mortadelas, entre outros. Para elaborar tais produtos, o abatedouro dispõe de salas apropriadas, para onde as carcaças são conduzidas e processadas.

A avaliação da eficiência do sistema de abate é efetuada por meio de análises laboratoriais, principalmente as microbiológicas. O monitoramento das condições

higiênico-sanitárias de abate, por meio de exames microbiológicos, é realizado tanto no ambiente quanto na carcaça. A carga microbiana das carcaças de frangos e seus derivados é representada por uma microbiota oriunda, principalmente, das aves vivas, e outra parte, incorporada em qualquer uma das fases do abate ou processamento. A microbiota da ave viva se encontra, essencialmente, na sua superfície externa (penas, espaço interdigital e tegumentos cutâneos), no trato digestivo e, em menor grau, no trato respiratório (ALMEIDA & SILVA, 1992).

As aves chegam aos abatedouros com bactérias firmemente aderidas na pele (LILLARD, 1989) e estas, inclusive salmonelas, não são facilmente removidas por um único enxágue com água (TOMAS & McMEEKIN, 1982; LILLARD, 1988; LILLARD, 1989).

Estudos mostram que a taxa mais alta de contaminação das carcaças de frangos ocorre nas primeiras operações do abate como pendura, sangria, escaldamento e depenagem (LAHELLEC & COLIN, 1984).

A água do tanque de escaldamento atua disseminando bactérias da pele e tegumentos cutâneos para outras partes da carcaça, principalmente pulmões (SCHINEIDER, 1973). Segundo MAY (1974), a lavagem final das carcaças reduz as contagens microbianas total e patogênica em frangos eviscerados.

Embora a temperatura da água de escaldamento entre 52 °C e 60 °C tenha ação antimicrobiana, a contaminação desta água por representantes da família Enterobacteriaceae, inclusive salmonelas pode ocorrer, e esses contaminantes podem persistir (MULDER et al., 1978; LAHELLEC & COLIN, 1984). Segundo ALMEIDA & SILVA (1992), a contaminação de carcaças de frango por bactérias reduz progressivamente durante as operações de abate e realçam a depenagem e evisceração como pontos críticos de contaminação, principalmente para as bactérias presentes no trato digestivo. Após as operações de sangria e escaldamento, cerca de 100 % das carcaças apresentam-se contaminadas. Este percentual cai para 90 % nas operações de depenação e para 30 % na evisceração, em seguida, aumenta para 40 % nas operações de pré-resfriamento e novamente cai para 30 % no resfriamento propriamente dito. De uma forma geral, todas as operações de abate podem resultar em contaminação microbiológica cruzada, sendo a contaminação intestinal uma fonte mais comum do que a cutânea.

O tanque de resfriamento participa na contaminação cruzada das carcaças. A carga microbiana das carcaças, ao sair do tanque, depende da contaminação inicial destas antes do resfriamento, da vazão da água e da relação de aves por volume de água

(PERIC et al., 1971). A ocorrência de salmonelas em carcaças é sempre maior após o resfriamento com água fria (LILLARD, 1990). Segundo o Serviço de Inspeção Federal dos Estados Unidos, a porcentagem de carcaças contaminadas por salmonelas aumenta de 5 % para 36 %, nos momentos antes e após o resfriamento, respectivamente (apud LILLARD, 1990).

O tratamento das carcaças com ácido fosfórico a 0,01% durante o resfriamento exerce controle bacteriano efetivo, segundo ALMEIDA & SILVA (1992). Os mesmos autores relataram que esta eficácia é maior quando a concentração de cloro residual é de 2,0 mg/L em comparação com 0,3 mg/L; a eficiência também é maior contra enterobactérias, principalmente salmonelas, comparado a bactérias heterotróficas aeróbias. Embora seja pouco prática, observou-se que a obstrução da cloaca de frangos com tampões introduzidos imediatamente após a sangria e o tratamento das carcaças com ácido fosfórico no estágio final de resfriamento têm influência na redução da contaminação das carcaças por bactérias heterotróficas aeróbias e enterobactérias (ALMEIDA & SILVA, 1992).

Segundo ELLERBROEK (1997), as mais altas contagens ambientais de enterobactérias em abatedouro de frango foram detectadas na área da recepção, enquanto nas áreas de cortes e desossa as contagens foram baixas. A microbiota da área de recepção, evisceração e câmaras frias diferiram em suas composições. A microbiota da área de entrada consistiu principalmente de bactérias Gram-positivas como: *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus* sp., além de leveduras. As bactérias predominantes na área de evisceração foram também Gram-positivas, destacando *Staphylococcus* sp., mas se mostraram presentes também, bactérias Gram-negativas como: *Moraxella* sp. e *Actinobacter*. A microbiota predominante na área de pré-resfriamento foi composta de *Corynebacterium* sp., *Acinetobacter* sp. e *Moraxella* sp., assim como *Micrococcus* sp. e *Alcaligenes* sp. A identificação dos isolados de enterobactérias, não revelou a presença de *Salmonella* sp.

2.3-Métodos microbiológicos convencionais

Segundo a Comissão Internacional de Especificação Microbiológica em Alimentos - ICMSF (1982) e a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003a), os métodos para

isolamento e identificação de salmonelas a partir dos alimentos usualmente são divididos em seis etapas sucessivas:

- 1-Enriquecimento não-seletivo.
- 2-Enriquecimento seletivo.
- 3-Semeadura em placa de meios sólidos seletivos e diferenciais.
- 4-Determinação das características bioquímicas das colônias suspeitas, em meios adequados.
- 5-Análise antigênica, em duas fases: emprego do antisoro polivalente O e do antisoro polivalente H.
- 6-Tipificação por meio de bacteriófagos.

O primeiro passo tem como finalidade a revitalização das salmonelas injuriadas pelas diferentes condições de tratamentos industriais e armazenamento. É realizado tradicionalmente pelo cultivo das amostras em Caldo Lactosado ou Água Peptonada para proporcionar crescimento microbiano.

O segundo passo é o enriquecimento seletivo e serve para favorecer o crescimento das salmonelas frente a outros microrganismos competidores como, coliformes, *Proteus* e *Pseudomonas*. Recomenda-se, para este propósito, o uso do Caldo Selenito-Cistina (SC) e do Caldo Tetrationato (TT) ou, atualmente, o Rappaport Vassiliadis (RV).

O terceiro passo permite a visualização das colônias com características morfológicas suspeitas pelo seu aspecto característico. Recomenda-se que cada laboratório utilize um meio diferencial de sua escolha, como o ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS), ágar Rambach, ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), ágar Bismuto Sulfito (BS), ou ágar Verde Brilhante (VB).

O quarto passo consiste na identificação bioquímica. As colônias típicas passam por uma identificação bioquímica preliminar em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA). Aqueles isolados que apresentarem reações típicas em qualquer um dos meios, TSI ou LIA, são submetidos à análise bioquímica complementar com os testes de hidrólise da uréia, fermentação de carboidratos (dulcitol, lactose e sacarose), reações de IMViC (índol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato), degradação do malonato e descarboxilação da lisina.

Os isolados que apresentarem reações bioquímicas características de *Salmonella* são submetidos análise antigênica, que consiste no quinto passo. São consideradas

positivas as amostras com reações bioquímicas características e com reações positivas nos dois testes sorológicos por aglutinação, utilizando antisoros polivalentes somático (O) e flagelar (H).

O sexto passo, a tipificação por bacteriófagos, leva a uma identificação mais exata dos microrganismos isolados, de particular interesse para propósitos epidemiológicos.

A pesquisa normalmente se atém ao nível qualitativo (presença ou ausência) e do gênero (*Salmonella*) uma vez que pela Instrução Normativa nº 62, que rege os métodos oficiais de análise microbiológica de produtos de origem animal e água; a pesquisa se limita ao gênero, e este deve estar ausente em 25 g ou mL de amostra (BRASIL, 2003a).

As técnicas de cultura são mundialmente reconhecidas como o método padrão para a detecção de patógenos bacterianos como a *Salmonella* em amostras de alimentos. Em teoria, estes métodos são capazes de detectar uma única célula viável em uma amostra de alimento seguindo os estágios de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo (BENNETT et al., 1998).

Apesar da técnica de análise microbiológica convencional ser a mais utilizada e consagrada como método referência, é constituída por protocolos demorados, que podem ocupar entre cinco e até sete dias; e trabalhosos, devido à necessidade de muitos reagentes e vidraria, principalmente se for processado um grande número de amostras, como as que são exigidas na indústria de alimentos. Neste caso, a técnica, apesar de confiável, se mostra pouco prática e eficiente, principalmente para a rotina de inspeção sanitária, que necessita de resultados rápidos e seguros, para liberar ou não os lotes de aves para consumo.

Segundo DE MÉDICI et al. (1998), a técnica microbiológica convencional é muito demorada e não é adequada à rotina de monitoramento para grande número de amostras. A indústria do frango têm rotineiramente aplicado métodos para a detecção de salmonelas para se obter dados de riscos de contaminação em sua cadeia produtiva e é desejável que o método de monitoramento possa ser aplicado para um grande número de amostras a custos baixos. Assim, métodos mais rápidos e sensíveis são necessários. Muitas técnicas alternativas e aprimoradas como hibridização de DNA (STONE et al., 1994), anticorpos fluorescentes e ELISA (THOMASON, 1971; DUFFEY et al., 1992) foram desenvolvidas. Entretanto, problemas na eficiência de detecção destes métodos têm limitado seu uso em rotina (GARRETT et al., 1993).

O desenvolvimento de ensaios de detecção rápidos para *Salmonella* sp. irão propiciar às agências oficiais e às indústrias de alimentos, num futuro próximo, a identificação de alimentos contaminados de uma maneira muito mais eficiente e rápida. Além disso, essas novas ferramentas permitirão a tomada de decisões em tempo real, que consiste em um fator crucial quando se trata de produtos altamente perecíveis.

2.4-Detecção de *Salmonella* sp. por Imunoanálise

O princípio de detecção de microrganismos por meio de imunoanálise se baseia na interação entre antígenos e anticorpos e pode ser encontrado comercialmente no sistema de reações imunoenzimáticas VIDAS®. Este sistema é patenteado pelo Laboratório Biolab-Mérieux S.A. (BIOLAB-MÉRIEUX S.A. s.d.). Segundo o fornecedor do referido sistema, a detecção de *Salmonella* por protocolos tradicionais e fastidiosos, pode levar até cinco dias ou mais para assegurar a sua ausência em uma amostra, assim os imunoensaios enzimáticos podem contribuir para acelerar e simplificar esta detecção.

O teste VIDAS® para *Samonella* é um teste imunoensaio automatizado para a detecção das salmonelas nos produtos alimentares e nas amostras ambientais. O sistema utiliza uma mistura de anticorpos monoclonais de captura de grande afinidade, dirigidos contra os antígenos O e H, que permite a detecção de sorotipos móveis e imóveis de *Salmonella* sp. Os resultados são obtidos em cerca de 45 minutos após o início do teste, sem contar o processamento prévio das amostras, que consiste em ferver, por 15 minutos uma alíquota contendo 1 ml de cada caldo de enriquecimento seletivo utilizado no método convencional. Contando este tempo total, a técnica oferece resultados em, aproximadamente, 48 horas. Uma vantagem que este processamento prévio de cultivo proporciona é o aumento da sensibilidade e a segurança de que as possíveis bactérias analisadas estejam viáveis, pois seu crescimento foi necessário no pré-enriquecimento e no enriquecimento seletivo.

O teste é qualitativo e permite a detecção de antígenos de *Salmonella* pela técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), que é derivada do ELISA (*Enzyme Linked Imunno Assay*), apresentando como diferença o substrato metil-umbeliferil fosfato, responsável pela revelação. Este, depois de hidrolisado pela fosfatase alcalina, torna-se fluorescente.

O cone de utilização serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem para o teste. O interior do cone está revestido com anticorpos anti-*Salmonella* sp. adsorvidos em sua superfície. Os outros reagentes se encontram prontos para utilização no barrete. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no aparelho.

Uma alíquota do caldo de enriquecimento seletivo é colocada no barrete e a amostra é submetida a um ciclo de afluxo e refluxo, através do cone, cuja duração foi especificamente calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes no meio vão fixar-se aos anticorpos monoclonais anti-*Salmonella* sp. fixados no interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos livres. Em seguida, os anticorpos conjugados marcados com fosfatase alcalina são aspirados e rejeitados pelos cones e vão fixar-se aos antígenos de *Salmonella* sp., que já se encontram fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato metil-umbeliferil fosfato é aspirado e rejeitado pelo cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato no produto 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm.

O sistema, que pode ser utilizado no diagnóstico de uma série de microrganismos e algumas toxinas, é reconhecido por entidades internacionais de saúde pública e qualidade alimentar e funciona, atualmente, em mais de 5.100 estabelecimentos no mundo (BIOLAB-MÉRIEUX S.A. s.d.), contudo sua utilização ainda é pouco relatada na literatura científica.

Podem-se citar alguns trabalhos que utilizaram o referido sistema na pesquisa de microrganismos como o de BOURLET et al. (2005), que o utilizou no diagnóstico do vírus HIV humano; o de VAZ-VELHO et al. (2000), que o utilizou na pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos como o peixe; e o de ISLAM et al. (2006), que utilizou o sistema na pesquisa de toxina “shiga-like” de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de carne e fezes de animais.

No trabalho de WALKER et al. (2001) foi feita a pesquisa de *Salmonella* sp. de amostras de leite de vacas da Califórnia, Estados Unidos, utilizando a técnica microbiológica convencional e o sistema VIDAS®. O trabalho demonstrou correlações de 95,57 % e 97,5 % entre os resultados das duas técnicas. O autor destaca as vantagens do sistema frente à microbiologia convencional como maior rapidez, facilidade e praticidade.

Segundo DE MÉDICI et al. (1998), em se tratando de amostras de campo, aparentemente a técnica microbiológica convencional é moderadamente mais sensível que métodos mais rápidos, como o VIDAS®, entretanto, os dados obtidos neste último

sistema e da microbiologia convencional apresentaram-se praticamente idênticos, tanto em condições experimentais, quanto de campo. Os autores sugerem que o VIDAS® poderia ser utilizado como um substituto viável para o método tradicional, por ser mais rápido e prático na execução, sendo particularmente vantajoso para a utilização em produtos com período de validade reduzido, ou quando resultados rápidos são necessários. Além disso, o sistema se mostra adequado para a aplicação no APPCC. Os mesmos autores também concluíram que não existem maiores diferenças quanto a eficiência de detecção quando se compara o VIDAS® e os métodos convencionais de análise microbiológica, quando as amostras a serem processadas apresentam mais que 10 células de *Salmonella*, independente da presença de bactérias concorrentes na suspensão (DE MEDICI et al., 1998).

2.5-Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Segundo CARVALHO & PIMENTEL (2001), a técnica da reação da polimerase em cadeia foi idealizada por Kary Mullis e Randall Saiki na década de 1980 e desde então, revolucionou a genética molecular por ter possibilitado uma abordagem completamente nova para o estudo dos genes. Com a PCR, é possível produzir um número enorme de cópias de uma sequência específica de DNA sem necessidade de clonagem. A PCR permite a replicação *in vitro* de sequências definidas de DNA, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas aquelas que flanqueiam a região a ser amplificada, definida por iniciadores, que hibridizam com estas regiões (MULLIS et al., 1986).

Após a extração da amostra de DNA de organismos ou células, um processo no termociclador é iniciado por um aquecimento de 95 °C por 5 minutos. Nessa temperatura, a fita dupla de DNA é completamente separada, formando as fitas simples que servirão de molde para os iniciadores e a DNA polimerase. Em seguida, a temperatura é diminuída para uma temperatura de anelamento, que permite a ligação dos iniciadores à sequência reconhecida. Essa região delimitada será a região amplificada ao final do processo. A temperatura de anelamento é um ponto variável para determinar a especificidade de uma reação de PCR. Temperatura e tempo utilizados variam dependendo da sequência a ser amplificada. Nessa fase, gera-se o híbrido molde-iniciador necessário para a reação catalisada pela DNA polimerase. O

próximo passo é aumentar a temperatura para 72 °C por um tempo médio de 2 minutos. Em seguida, coletam-se as amostras amplificadas para se executar a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, juntamente com um controle positivo, um negativo e um marcador molecular de referência (MW), para se verificar a amplificação do segmento.

A amplificação de seqüências de DNA únicas de um organismo, usando a PCR, melhora tanto a velocidade de detecção quanto a sensibilidade a que organismos podem ser detectados (BUFFONE et al., 1991; RAMAMURTHY et al., 1993) e tem sido cada vez mais utilizado para identificar várias bactérias de alimentos e amostras clínicas (STONE et al., 1994). A PCR se tornou uma ferramenta poderosa e popular na identificação de microrganismos (PERSING, 1991) e vem sendo empregada com êxito para detecção de *L. monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *E. coli*, além de *Salmonella* sp., em diferentes alimentos, como carnes e leite (SANTOS et al., 2001).

A seleção das seqüências que flanqueiam os segmentos de DNA que se pretende amplificar por PCR é um ponto crítico da técnica. A especificidade da PCR decorre da precisão com que os iniciadores desempenham esta tarefa, ou seja, hibridizam com o DNA alvo. Para a detecção de salmonelas, a região escolhida deve ser comum à maioria dos sorotipos, codificar proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros microrganismos, o que poderia fornecer resultados falso-positivos (STONE et al., 1994). BÄUMLER et al. (1997) relataram vários iniciadores utilizados para detecção de salmonelas, como os específicos para as regiões/genes *invA*, *agfA*, *IS200*, *hin*, *H-li*, *iagAB*, *spvR*, *viaB*, *mkfA*, *ompC*, *oriC*, e citam como principal diferença entre eles a especificidade.

GALÁN et al. (1992) efetuaram a caracterização molecular de um dos genes de invasão de *Salmonella* e identificaram um locus genético, denominado *inv*, como o primeiro de um operon (unidade operacional responsável pela expressão e regulação de genes) de genes arranjados na mesma unidade transcricional, que codificaria proteínas relacionadas com penetração celular, sendo considerado um componente essencial para a patogênese da doença. Os grupos de genes *inv*, denominados A, B, C, D e E estão presentes na maioria das salmonelas e ausentes na região correspondente de *E. coli*, sendo considerados eficientes para distinguir *Salmonella* de outras espécies bacterianas através de hibridização com sondas específicas ou amplificação por PCR. O gene *invA* de *Salmonella* sp. é bastante utilizado para a detecção deste patógeno uma vez que está relacionado com a invasão celular da bactéria e portanto, detecta praticamente todos os sorotipos (SANTOS et al., 2001).

Foi possível amplificar um fragmento de DNA de 284 pares de base (bp), utilizando os oligonucleotídeos 139-141, específico para o gene *invA*, em nove sorotipos de *Salmonella* testados, não sendo observada amplificação de outros 18 microrganismos não *Salmonella* analisados, exceto da amostra de DNA de *E. coli*, facilmente distinta das amostras de *Salmonella* por gerar um produto de amplificação em torno de 300 pb. Não foi verificada amplificações inespecíficas como as de DNA humano ou de galinha presentes nas amostras (SANTOS et al., 2001).

Técnicas recentes de PCR para a detecção de *Salmonella* têm sido desenvolvidos com as vantagens de apresentar maior sensibilidade e velocidade (MANDRELL & WACHTEL, 1999). Protocolos cada vez mais sensíveis de PCR vêm sendo desenvolvidos (BENETT et al., 1998; RYCHLIK et al., 1999; AMAVISIT et al., 2001). A alta eficiência da PCR é atribuída ao fato desta técnica detectar seqüências alvo, não sendo influenciada por potenciais de crescimento de células, como ocorre na microbiologia convencional (WHYTE, et al., 2002). Outra vantagem do procedimento de PCR é que ele pode ser aplicado a amostras com vários espécimes microbianos sem necessidade de isolamento prévio de espécies de bactérias. Com isso, a economia em termos de tempo de execução é grande, quando comparada à microbiologia convencional.

As técnicas atuais de PCR podem identificar *Salmonella* sp. em menos de 24 horas, podendo o pré-enriquecimento ser de apenas 6 horas (WHYTE et al., 2002). A técnica apresentou maior sensibilidade quando utilizada em amostras artificialmente contaminadas do que em amostras naturalmente contaminadas. Esta diferença deve ser em decorrência de uma extração de DNA menos efetiva na amostra natural em decorrência de agregamentos ou sequestramentos celulares. A presença de alguns agentes tipicamente inibidores da reação de PCR, como sais biliares, bilirrubina, hemoglobina, uréia, polissacarídeos e fezes, também podem comprometer alguns resultados. Amostras testadas diretamente, sem o pré-enriquecimento de 6 horas, falharam na identificação de *Salmonella* (MANDRELL & WACHTEL, 1999).

Uma limitação para a adoção da PCR na detecção de *Salmonella* sp. é que apesar do número de estudos de validação reportados na literatura, existem poucos que determinam a sensibilidade e especificidade da PCR para a detecção de *Salmonella* em amostras naturalmente contaminadas (SOUTMET et al., 1994, 1997; OLIVEIRA et al., 2003). A maioria dos trabalhos utilizaram amostras artificialmente contaminadas (AABO et al., 1993; GOUWS et al., 1998; SCHRANK et al., 2001; LI & MUSTAPHA, 2002; WANG & YEH, 2002; UYTENDAELE et al., 2003). A viabilidade de bactérias

em amostras artificialmente contaminadas pode diferir daquelas presentes em amostras naturalmente contaminadas, que podem ter sido expostas a uma variedade de condições desfavoráveis e que apresentam alguns graus de injúria em razão de procedimentos adotados no transporte, estocagem e processamento (SOUMET et al., 1994; GOUWS et al., 1998). Além disso, a sensibilidade de um teste quando aplicado a amostras artificialmente contaminadas pode diferir significativamente da sua capacidade de detectar as cargas bacterianas comumente bem menores das amostras naturalmente contaminadas (GOUWS et al., 1998).

A prevalência de *Salmonella* sp. obtida de 90 amostras de carne de frango durante os trabalhos de MYINT et al. (2006), pela técnica microbiológica convencional onde foi utilizado o pré-enriquecimento com água peptonada e enriquecimento seletivo com o Rappaport Vassiliadis foi de 22%. Quando no enriquecimento seletivo foi utilizado o Caldo Tetracionato, houve 28% de prevalência. Nesse mesmo estudo, o teste de PCR sem pré-enriquecimento resultou em 0% de prevalência; e a adoção do pré-enriquecimento com água peptonada aumentou para 20% a prevalência de *Salmonella* sp. nas amostras analisadas. Quando esses mesmos autores utilizaram o pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo com caldo Rappaport Vassiliadis a prevalência encontrada foi de 22%; e finalmente, quando o caldo de enriquecimento seletivo foi o Tetracionato, o resultado obtido foi 28%. A sensibilidade da técnica de PCR obtida pela extração de amostras naturalmente contaminadas sem pré-enriquecimento foi de 0%; após pré-enriquecimento com água peptonada, a sensibilidade foi de 79%; após pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo com caldo Rappaport Vassiliadis, a sensibilidade foi de 83%; e quando o caldo de enriquecimento seletivo foi o Tetracionato, a sensibilidade foi de 100%. Não houve diferença estatística na sensibilidade obtida quando se comparou as três últimas técnicas ($p=0,7405$).

A contaminação mínima em que ocorreu detecção de *Salmonella* sp. por PCR foi de 128 UFC/ml de amostra (MYINT et al., 2006). As amostras positivas desse estudo requereram um pré-enriquecimento mínimo de 8 horas para que pudessem ser detectadas.

Os resultados de SCHRANK et al. (2001) também corroboram os achados de MYINT et al. (2006), uma vez que demonstraram maior eficiência na pesquisa de *Salmonella* sp. por PCR quando a amostra analisada foi obtida do enriquecimento seletivo de caldo Tetracionato quando comparado ao caldo Selenito Cistina.

Segundo Cohen et al. (1994), o fato da PCR detectar uma região única de um genoma bacteriano confere a esta técnica maior especificidade quando comparada com os métodos microbiológicos convencionais.

A presença de *Salmonella* sp. em carne de frango quando da utilização da técnica de microbiologia convencional ficou em 16% (WHYTE et al., 2002). A técnica de PCR, partindo do pré-enriquecimento em água peptonada 37 °C por 24 h, foi mais sensível ao detectar a presença do patógeno em 19% das amostras. Quando as técnicas foram combinadas, o patógeno foi encontrado em 23% das amostras.

Os protocolos utilizados na detecção de *Salmonella* sp. em carne de frango por PCR são vastos e numerosos, contudo, existe uma unanimidade: todas as técnicas falham na detecção de amostras se estas não passarem, no mínimo, pelo pré-enriquecimento das amostras em meio de cultura (MANDRELL & WACHTEL, 1999; MYINT et al, 2006).

A análise por PCR pode ser utilizada como única técnica em testes de triagem de rotina quando a contaminação por *Salmonella* sp. nas aves é suspeita de ser baixa. Em situações de surtos ou aumento da prevalência, a combinação das técnicas de microbiologia convencional e PCR poderia ser aplicada para se ter um acesso mais real dos índices de contaminação nas aves e do potencial de transmissão do patógeno (WHYTE et al., 2002).

SCHRANK et al. (2001), também afirmaram que a técnica de PCR foi mais sensível na detecção de *Salmonella* sp., em animais infectados, do que o método convencional, que confirmou apenas 47% de todos os resultados positivos por PCR.

Contudo, existem trabalhos que demonstram uma maior eficiência da microbiologia convencional como no trabalho de DICKEL et al. (2005), em que houve comparação das técnicas de microbiologia convencional, ELISA e PCR para a detecção de *Salmonella* em amostras de frango. A primeira técnica apresentou 26% de prevalência, a segunda, 17,8% e a última 12,2%, sendo que entre as duas últimas não houve diferença estatística. Os autores destacaram a possibilidade de resultados falso positivos na técnica de ELISA pela ocorrência de reações cruzadas com outras enterobactérias. Quanto à técnica de PCR, os autores discutiram a interferência pela presença de inibidores como cloro que poderiam ter prejudicado a eficácia da técnica.

Segundo CERRO et al. (2002), já foram descritas variantes da técnica de PCR padrão para a detecção de *Salmonella* como Multiplex-PCR (WAY et al., 1993, CHIU & OU 1999), Nested-PCR (RYCHLIK et al., 1999) e TaqMan (KIMURA et al., 1999). Kits comerciais de PCR também já foram relatados (FACH et al., 1999).

2.6-Sistema APPCC

Segundo a ICMSF (1995), o conceito de Análises dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) ou Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) é uma proposta sistematizada de identificação, determinação e controle de perigos. Foi apresentada e delineada pela primeira vez na Conferência Nacional sobre Proteção de Alimentos em 1971 (APHA, 1972). Este sistema oferece uma abordagem racional para o controle dos perigos microbiológicos dos alimentos, evita as falhas inerentes à proposta tradicional de inspeção e não depende, necessariamente, da espera da análise microbiológica. Por focalizar a atenção nos fatores que afetam diretamente a segurança e qualidade microbiológica dos alimentos, elimina o emprego de recursos e considerações sofisticados.

O sistema é semelhante ao conceito de “Análise de Falhas, Modos e Efeitos” da engenharia, em que se observa, em cada etapa produtiva, os erros que podem ocorrer, suas prováveis causas e efeitos. Após estas definições, os mecanismos de controle podem ser estabelecidos (RASZL et al., 2001).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Portaria nº 46 de 10 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998a), instituiu o APPCC no Brasil, a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob regime do Serviço de Inspeção Federal – SIF.

Se um alimento foi produzido, processado e usado de acordo com o sistema APPCC, conclui-se que este possui alto grau de segurança sanitária.

O sistema é aplicável em todas as etapas da cadeia produtiva de alimentos, desde a matéria prima, incluindo processamento, transporte, comercialização e, por fim, o uso em estabelecimentos de alimentação ou residências.

Termos e componentes do APPCC

O Sistema APPCC compreende as seguintes etapas sequenciais, também denominadas princípios do APPCC:

1. Identificação dos perigos e determinação da gravidade destes perigos e seus riscos. O perigo significa uma contaminação inaceitável, desenvolvimento inaceitável e, ou sobrevivência inaceitável de organismos relacionados com a segurança ou deterioração e, ou produção, e permanência inaceitável de produtos

do metabolismo microbiano ou outros de natureza química ou física. O risco é uma estimativa da possibilidade de ocorrência do perigo.

2. Determinação do Ponto Crítico para Controle (PCC), pelo qual um perigo identificado pode ser controlado. Um PCC representa uma situação, procedimento ou processo no qual pode ser exercido o controle de um ou mais fatores que, se controlados, podem diminuir ou eliminar um perigo.
3. Estabelecimento e critérios que poderiam indicar se uma operação está sob controle em um PCC em particular. Critérios são as bases para o estabelecimento dos limites relacionados aos perigos.
4. Estabelecimento e implementação de processos para monitorar cada PCC a fim de verificar se este está sob controle, ou seja, dentro dos limites. Monitoramento é a comprovação de que o processo ou manipulação de cada PCC está sendo conduzido adequadamente e que está sob controle. Envolve a observação sistematizada, medida e, ou registro dos fatores significantes necessários para o controle. As técnicas de monitoramento escolhidas devem ser capazes de ações a serem tomadas para retificar uma situação fora de controle, mesmo depois de seu início ou durante a operacionalização de um processo. São usadas cinco formas principais de monitoramento: a observação visual, avaliação sensorial, medidas físicas, testes químicos e análises microbiológicas rápidas. Como a eficácia do monitoramento em termos de PCC está relacionada com a rapidez na obtenção de resultados, a observação visual é, com frequência, a mais útil.
5. A tomada de qualquer ação corretiva é necessária quando o resultado do monitoramento indicar que um determinado PCC não está sob controle.
6. Verificação, que é o uso de informações suplementares para assegurar que o sistema APPCC é efetivo.

Segundo LEITÃO (1999), quando se foca a produção de alimentos de origem animal, grande importância tem sido dada aos perigos de origem biológica, principalmente pelo fato desses perigos serem os de ocorrência mais frequente nos produtos de origem animal.

WALDROUP (1996) e RASZL et al. (2001) destacaram os maiores e mais citados perigos biológicos veiculados por produtos de aves, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Clostridium perfringens*.

O Sistema APPCC na cadeia produtiva de aves

A produção e processamento de aves para o consumo humano ocorrem em pequenas fazendas ou criações de fundo de quintal, até grandes empresas. A produção intensiva comum em muitos países desenvolvidos abrange reprodução, incubação, criação, postura de ovos, alimentação e abate de grandes quantidades de aves. As grandes quantidades e a estreita proximidade das aves tornam difícil o cumprimento de medidas de controle eficientes e exacerba os efeitos perniciosos da introdução de patógenos num grupo de aves. Por isso, não causa surpresa que a carne de frango seja frequentemente origem de patógenos veiculados por alimentos.

A ICMSF (1995) destaca que cada plano APPCC deve ser específico para cada produto e cada processo produtivo. Cada indústria deverá definir, de acordo com a sua estrutura, equipamentos e mão-de-obra, onde estão suas principais falhas e então estabelecer seus pontos de controle. Esta comissão destaca algumas etapas (Figura 1) e alguns possíveis pontos críticos de controle (PCC) na cadeia produtiva de aves, que podem servir como base e orientação na implementação dos pontos críticos de cada empresa.

Produção

Nas granjas, são feitas várias tentativas para minimizar a contaminação das aves por microrganismos patogênicos. Estas incluem a criação de lotes livres de *Salmonella*, o uso de ração livre de *Salmonella* sp., de alojamentos a prova de roedores e de pássaros, a destinação adequada de aves doentes ou mortas, o uso de vestuário protetor e desinfetado, o manejo adequado e a correta higienização dos galpões. Apesar destas medidas, aves vivas que não apresentam sintomas de doença podem carrear pequenas quantidades de *Salmonella* sp. e excretá-las, contaminando assim, o ambiente.

Abate

As operações dos mais modernos abatedouros de aves são vastamente automatizados com insensibilização elétrica e corte mecânico dos vasos sanguíneos do pescoço. Geralmente a linha de processamento desloca-se com tamanha rapidez que se torna impossível conseguir uma independência higiênica entre as carcaças. Isto significa que a salmonela de uma ave infectada poderá espalhar-se em muitas carcaças através da

contaminação das várias peças de equipamentos que entram em contato com cada carcaça. Sem retardar a linha de processamento, tudo que pode ser feito é prestar uma atenção especial às operações que mais provavelmente provocarão a difusão da contaminação.

Controle: O controle na granja depende da aplicação de boas práticas agrícolas e é afetado adicionalmente pelas medidas tomadas nas granjas de reprodução e incubatórios.

Monitoramento: São observadas as condições higiênicas na granja e revisados os registros de doenças.

Verificação: Podem ser feitas análises em busca de *Salmonella* sp. em amostras de ração, como também em amostras de ambiente.

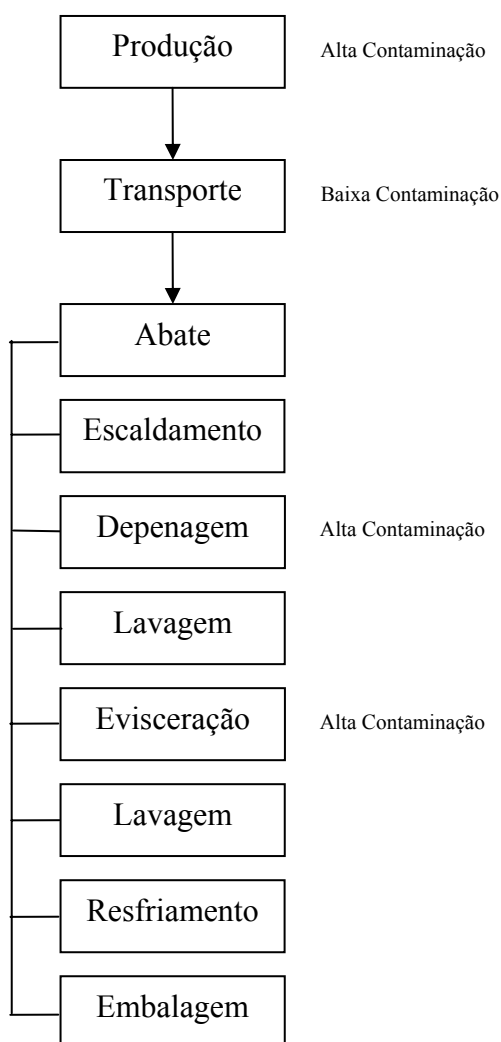


Figura 1. Fluxograma da produção de carne crua de aves e graus de contaminação.

Fonte: ICMSF (1995)

Escaldamento

As carcaças são escaldadas para facilitar a remoção das penas. O método mais comum é o escaldamento por imersão, que geralmente constitui um PCC (Figura 1), devido à oportunidade de disseminar patógenos de uma ave a outra. A contaminação da superfície externa e dos tratos intestinal e respiratório é liberada continuamente dentro da água de imersão. Outros métodos como, os jatos de água quente, jatos de vapor e simultâneos de vapor e de água quente podem ser encontrados, mas quase nunca são usados.

Controle: A multiplicação da contaminação pode ser evitada junto com os efeitos da alta temperatura pela vazão de água e substituição da água do tanque. O Departamento de Agricultura Norte Americano determina como medida de controle higiênico-sanitário, uma vazão de 1 litro por ave. As altas temperaturas do escaldador (superiores a 60 °C) são mais eficientes na eliminação de microrganismos na forma vegetativa do que as temperaturas mais baixas comumente usadas (50 °C). Destaca-se que, às vezes, são preferidas temperaturas menores porque, estas, não prejudicam a pele e oferecem vantagens aos produtos finais, como aparência e conservação.

Monitoramento: Devem ser monitoradas a temperatura da água e a taxa de vazão.

Depenagem

A depenagem é uma operação em que muitas vezes está envolvida a contaminação cruzada entre carcaças. Através desta contaminação pode-se investigar a eficiência da limpeza da máquina de depenar, uma vez que neste estágio do processamento, muitas bactérias podem aderir firmemente às superfícies internas da máquina ou mesmo penetrar nas penas das aves. A depenagem é uma fonte importante de contaminação, embora, teoricamente, nenhum novo organismo esteja sendo introduzido neste processo. A limpeza eficiente das máquinas depenadoras, sobretudo dos dedos arrancadores, evita a difusão de contaminantes de um dia de produção para outro, evitando assim, a contaminação de diferentes lotes de aves.

Lavagem

A lavagem a jato das carcaças após a depenagem e nos outros estágios do processamento remove o material contaminante fracamente aderido juntamente com uma parte da microbiota, mas muitos microrganismos permanecem ligados aos tecidos superficiais.

Monitoramento: Examinam-se as carcaças em busca de evidências de matéria fecal ou de outras sujidades.

Evisceração

Muitas vezes a evisceração produz contaminação adicional das carcaças, especialmente por organismos da microbiota intestinal. Nas várias operações envolvidas na remoção de miúdos comestíveis e não comestíveis, existem muitas oportunidades de contaminação cruzada da cavidade visceral e do exterior da carcaça, por organismos entéricos, como a *Salmonella* sp. A introdução de sistemas mecânicos para a evisceração diminui a difusão da contaminação por parte dos operadores, mas, a menos que estejam funcionando perfeitamente, a ruptura mecânica dos intestinos pode resultar em grande contaminação.

Controle: A habilidade do operador e o uso de técnicas corretas são tão importantes quanto a velocidade da operação.

Monitoramento: Observar as carcaças à procura de sinais de contaminação. As carcaças contaminadas com fezes devem ser condenadas. Verificar, freqüentemente, o ajuste das máquinas de evisceração automática.

Lavagem

Após a evisceração e a inspeção, as carcaças normalmente são lavadas a fim de diminuir a contaminação que ocorre durante essas operações. Como, com o tempo, a contaminação microbiana torna-se mais firmemente ligada à pele, a lavagem deve ocorrer tão rapidamente quanto possível e abranger tanto a cavidade abdominal quanto a superfície externa da carcaça.

Monitoramento: Certificar-se, pela observação, que a superfície da carcaça e a cavidade abdominal estão sendo completamente lavadas.

Resfriamento

Se por um lado, o resfriamento retarda a multiplicação de bactérias deterioradoras e inibe o crescimento de patógenos, por outro atua na contaminação cruzada das carcaças. Por este motivo, o resfriamento quase sempre é um importante PCC. O método mais utilizado é o de imersão, em contracorrente, com água fria, clorada, com ou sem gelo.

Controle: Os resfriadores de imersão contínua podem promover redução da contaminação bacteriana, contanto que as condições de uso e de temperatura da água sejam convenientemente controladas. O cloro, na concentração de até 50 mg/L residual, (ICMSF, 1995) pode ser acrescentado à água do resfriador e reduz eficientemente qualquer contaminação cruzada. O resfriamento em tanques estáticos, usados principalmente em pequenas instalações processadoras usa, aproximadamente, quantidades iguais de gelo, água e carcaças, mantidas por 4 a 24 horas.

Monitoramento: Medem-se a vazão da água, sua temperatura e concentrações de cloro.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Amostragem e delineamento experimental

Esta pesquisa foi desenvolvida em um abatedouro de aves, localizado no estado de Minas Gerais, Brasil. Com capacidade de abate de aproximadamente 165.000 aves/dia; este abatedouro está processando à plena capacidade e atualmente, abastece os mercados interno e internacional.

O serviço de Inspeção Federal faz o acompanhamento do abate no referido estabelecimento com medição de vários parâmetros previstos pela Portaria Ministerial nº 210 (BRASIL, 1998b), como, o teor de cloro, a temperatura da água do pré-resfriamento e a renovação de água nos tanques de pré-resfriamento. Durante o experimento, o teor de cloro residual livre manteve-se entre 0,5 mg/L e 1,0 mg/L na água de abastecimento utilizada nos chuveiros de lavagem de carcaça e 3,0 mg/L e 4,0 mg/L na água dos tanques de pré-resfriamento. A renovação de água nos tanques de pré-resfriamento manteve-se em torno de 1,5 L/carcaça no primeiro estágio e 1,0 L/carcaça no segundo estágio, e temperatura da água no ponto de entrada da carcaça em cada um dos estágios foi de 16 °C e 4 °C respectivamente. A temperatura das carcaças na saída do sistema de pré-enriquecimento variou de 5 °C a 10 °C. Esses dados estão em conformidade com a legislação nacional que regulamenta o processo de abate e produção de carne de aves no Brasil (BRASIL, 1998b).

No processo de abate, 135 carcaças foram analisadas em cinco fases diferentes do fluxograma de abate (Figura 2), perfazendo um total de 27 amostras por fase

analisadas pela microbiologia convencional, 14 pela imunoanálise e 18 pela PCR. As 135 amostras deram origem às amostras utilizadas nos três métodos de pesquisa.

Os pontos de coleta selecionados na pesquisa foram (Figura 2):

A: Antes do chuveiro de higienização, após a depenagem.

B: Após o chuveiro de higienização.

C: Após a evisceração manual.

D: Após o chuveiro de lavagem final.

E: Na saída do pré-resfriamento.

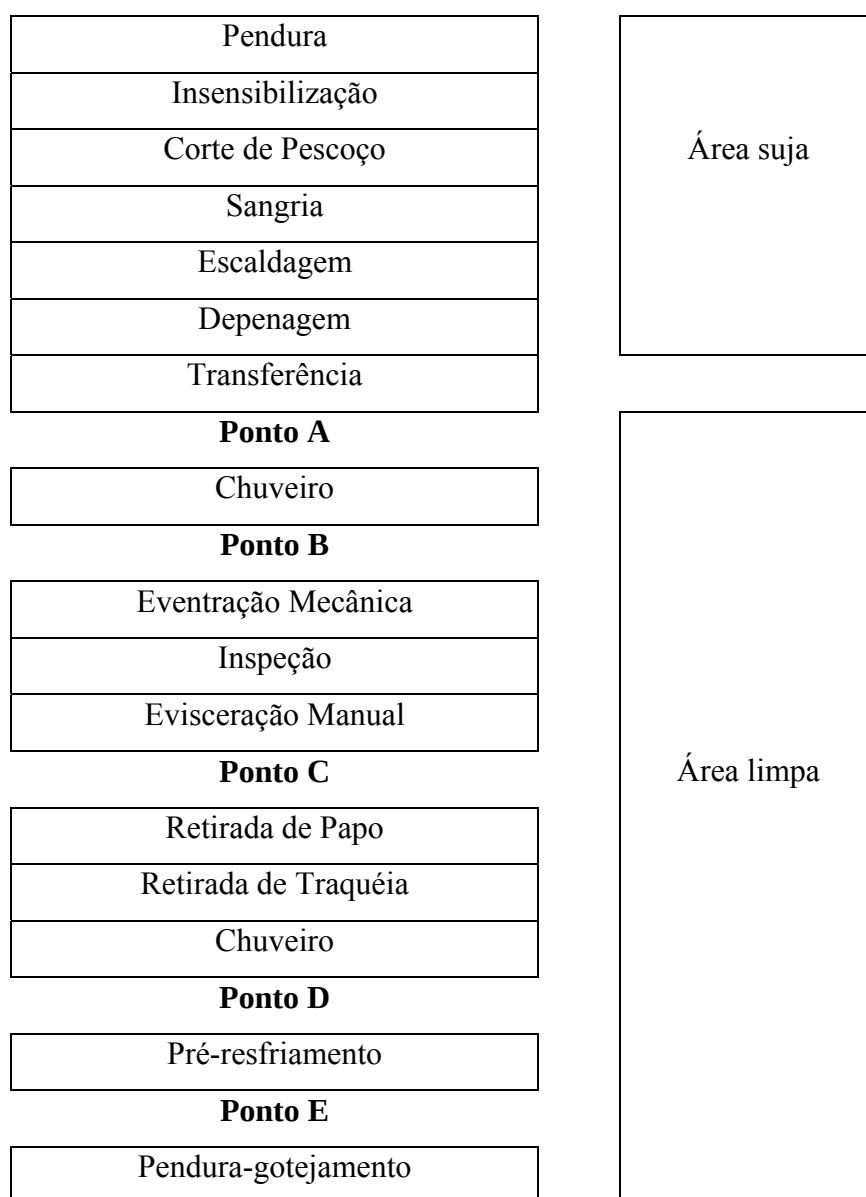


Figura 2. Fluxograma do abate de frangos e os pontos de coleta das amostras.

Cada unidade amostral foi composta de esfregaços superficiais equivalentes a 50 cm² de área de carcaças, obtida com o auxílio de esponjas estéreis cúbicas de poliuretano com quatro centímetros de aresta, previamente embebidos em água peptonada tamponada 0,1 %. Cada área de coleta foi delimitada por molde estéril com área interna de 25 cm², utilizados em dois locais diferentes na carcaça: no peito, próximo ao pescoço; e na região dorsal, adjacente à cloaca.

Após a coleta, as esponjas foram transferidas em condições assépticas para sacos estéreis tipo “Wirl-Parker”. O material coletado foi acondicionado em recipientes isotérmicos com gelo e conduzido imediatamente ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, para as análises bacteriológicas.

3.2-Ensaio Laboratoriais

No mesmo dia da coleta as amostras foram homogeneizadas em 50 mL de água peptonada tamponada a 0,1 %, durante 1 minuto, em homogeneizador peristáltico (Stomacher), para o preparo do homogenato destinado aos ensaios microbiológicos.

3.2.1-Microbiologia Convencional

A pesquisa de *Salmonella* sp. seguiu a metodologia descrita pela Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas em Alimentos (ICMSF, 1982.) e adaptada segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003a). A partir do homogenato obtido, 25 mL de amostra foi usado para a detecção de *Salmonella* em 135 amostras, sendo 27 por ponto de coleta.

Para o isolamento e identificação de *Salmonella* sp., as amostras inicialmente foram submetidas ao pré-enriquecimento em Água Peptona Tamponada 1% com incubação a 37°C por 20 horas, seguida do enriquecimento seletivo em Caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e Selenito Cistina (SC), respectivamente a 42 °C e 37 °C, por 24 horas em banho-maria. O isolamento foi feito em ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), a 37 °C por 24 horas. As

colônias típicas passaram por uma identificação bioquímica preliminar em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), incubados a 37 °C por 24 horas. Aqueles isolados que apresentaram reações típicas em qualquer um dos meios anteriores foram submetidos à análise bioquímica complementar com os testes de hidrólise da uréia, fermentação de carboidratos (dulcitol, lactose e sacarose), IMViC (indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato), degradação do malonato e descarboxilação da lisina.

Complementarmente, realizaram-se os testes sorológicos de aglutinação com anti-soros polivalentes somático (O) e flagelar (H) de referência (PROBAC, São Paulo/Brasil). Consideraram-se como positivas, as amostras com reações bioquímicas características e com reações positivas nos dois testes sorológicos.

3.2.2-Imunoanálise

A detecção de *Salmonella* pelo método imunoanalítico foi conduzido utilizando-se o sistema VIDAS[®], no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram destinadas 70 amostras para as análises, sendo 14 por ponto de coleta.

Alíquotas de 1 mL de cada caldo de enriquecimento seletivo de cada amostra foram submetidos à fervura em banho-maria por 15 minutos para a exposição dos antígenos. Este material foi usado para o ensaio imunoenzimático seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.3-Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Todas as reações de PCR foram conduzidas no Laboratório de Virologia Molecular Animal localizado no BIOAGRO na Universidade Federal de Viçosa. Noventa amostras foram destinadas a estas análises, sendo 18 por ponto de coleta. Estas amostras foram alíquotadas a partir do caldo pré-enriquecido da análise convencional e mantidas congeladas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL até a realização das análises de PCR.

O controle positivo utilizado foi *S. cholerae* ATCC 13076 fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

O DNA presente nas amostras analisadas e nas culturas usadas como controle foi extraído pela técnica fenol-clorofórmio (OLIVEIRA et al., 2003).

Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram o 139-141, específicos para o gene *invA* de *Salmonella* sp. (GALÁN et al., 1992; RAHN et al., 1992), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Pares de oligonucleotídeos utilizados para a reação da polimerase em cadeia na pesquisa de *Salmonella* sp.

Oligonucleotídeo	Gene alvo	Comprimento	Sequência (5' → 3')	Produto de amplificação (pb)
139 (forward)	<i>inv A</i>	26	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3'	284 pb
141 (reverse)	<i>inv A</i>	22	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	284 pb

A mistura para a reação de PCR foi preparada em água estéril MILLI Q; consistindo de Tris-Cl 10 mM, pH 9,0 a 25 °C; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 0,3 mM de cada um dos dNTPs; 0,3 M de cada oligonucleotídeo e Taq DNA polimerase 1 U/μL. Aliquotas de 21 μL da mistura de reação foram colocados em tubos de 0,2 mL (modificado de OLIVEIRA et al., 2002). Após a adição do DNA (4 μL), a mistura foi transferida para um termociclador (MJC, Inc. PTC-100).

A programação do termociclador consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 minutos (modificado de OLIVEIRA et al., 2003).

Após o término de cada reação de PCR, as amostras foram separadas, junto com o marcador molecular de 100 pb (GIBCOBRL), um controle positivo e um controle negativo; em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídio 0,5 μg/mL. Após o término das eletroforeses, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta.

Foi selecionada para clonagem, uma amostra positiva na PCR utilizando-se o Kit de clonagem p-GEM – T Easy Vector System I (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, colônias brancas foram selecionadas como positivas e as amostras de DNA plasmidiais foram purificados utilizando o “Kit GFXTM PCR and DNA purification” (AMERSHAM BIOSCIENCES), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra foi enviada ao Laboratório de Genômica/BIOAGRO/UFV para sequenciamento da cadeia de nucleotídeos. As

seqüências de nucleotídeos foram comparadas com demais seqüências de microrganismos relacionados no GenBank utilizando o programa “Basic Alignment Search Tool” (BLAST).

3.3-Análise Estatística

Por meio da estatística descritiva foram analisadas as taxas de frequência de detecção de *Salmonella* sp. nas carcaças separadas pelas diferentes etapas de abate e pelos métodos de pesquisa.

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para a análise das possíveis diferenças de detecção por *Salmonella* sp. entre os métodos microbiológico convencional, imunoanalítico e PCR. Os dados obtidos ainda foram utilizados para identificar e quantificar as chances de detecção entre os diferentes métodos. A quantificação destas chances foi determinada pela Razão de Chances ou “Odds Ratio” (OR) e a significância foi testada pelo intervalo de confiança (IC) mínimo de 95%.

Os procedimentos estatísticos como o cálculo do Qui-quadrado (χ^2) e da “Odds Ratio” (OR) foram efetuados, utilizando-se o programa Epi Info, do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na pesquisa de *Salmonella* sp. segundo as diferentes fases de abate e os métodos utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência (%) de detecção de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos em diferentes etapas de abate por método de análise.

Etapa de abate	Método	Imunoanálise	PCR
	Convencional	VIDAS [®]	
	N: 135, n: 27	N: 70, n: 14	N: 90, n: 18
A	1 (3,7)	4 (28,6)	5 (27,7)
B	2 (7,4)	4 (28,6)	6 (33,3)
C	3 (11,1)	2 (14,3)	6 (33,3)
D	4 (14,8)	6 (48,6)	7 (38,9)
E	1 (3,7)	0 (0)	3 (16,7)
Total	11 (8,1)	16 (22,8)	27 (30,0)

N: número total de amostras para cada método de análise.

n: número de amostras por etapa de abate.

Etapas de abate

A: Antes do chuveiro de higienização, após a depenagem.

B: Após o chuveiro de higienização.

C: Após a evisceração manual.

D: Após o chuveiro de lavagem final.

E: Na saída do pré-resfriamento.

Uma ilustração dos resultados obtidos pela análise de PCR pode ser visualizada na Figura 3.

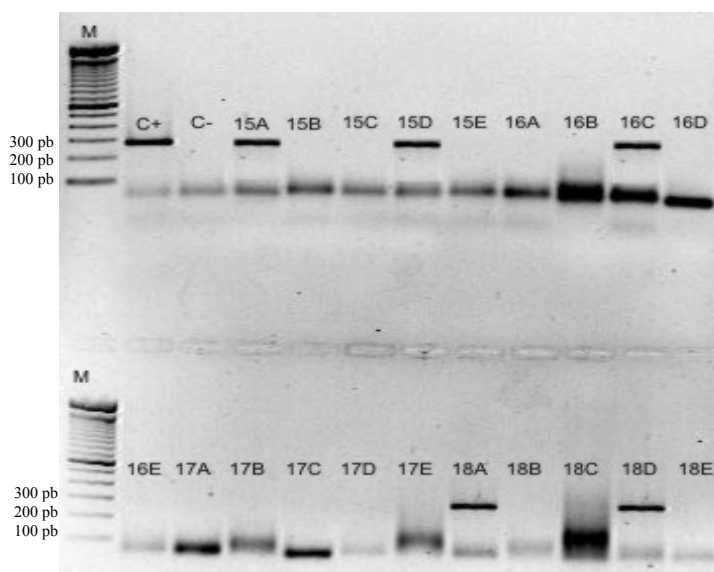


Figura 3. Ilustração da reação da PCR, utilizando as amostras positivas (15A, 15D, 16C, 18A e 18D) e negativas (15B, 15C, 15E, 16A, 16B, 16D, 16E, 17A, 17B, 17C, 17D, 17E, 18B, 18C e 18E), o marcador (M) de 100 pb (GIBCOBRL), um controle positivo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 13076 (C+), representado pelo segmento de 284 pb e um controle negativo de água MILLI Q autoclavada (C-).

Compararam-se as frequências totais de resultados positivos pelos métodos de microbiologia convencional, imunoanálise e por PCR, observando-se diferença estatística com um $\chi^2 = 18,51$ ($p \leq 0,01$) entre os três métodos analíticos.

Para a quantificação da chance de detecção por cada método foram feitas comparações dois a dois, partindo como referência da análise microbiológica convencional, por ser o método tradicionalmente empregado na pesquisa de *Salmonella* sp. (Tabela 3).

Houve diferença estatística com um $\chi^2 = 8,72$ ($p \leq 0,01$) entre os resultados obtidos pelo método imunoanalítico e pelo método microbiológico convencional. Foi quantificada esta diferença e o valor obtido foi OR = 3,34 (Intervalo de Confiança-IC: 1,36 - 8,32); ou seja, a chance de uma amostra contaminada ser detectada pelo método imunoanalítico é 3,34 vezes maior do que pelo método convencional.

Também houve diferença estatística com um $\chi^2 = 18,37$ ($p \leq 0,01$) entre os resultados positivos totais da técnica de PCR e do método microbiológico convencional. Foi quantificada esta diferença e o valor obtido foi OR = 4,83 (IC: 2,13 - 11,15); o que

significa que a chance de uma amostra contaminada ser detectada pela técnica de PCR é 4,83 vezes maior do que pelo método convencional.

Contudo, quando foram comparados os resultados positivos totais do método imunológico e da técnica de PCR não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

O cálculo do custo de execução de cada um dos métodos, por amostra, também foi efetuado, considerando apenas os reagentes e meios de cultura necessários. O método convencional apresentou um custo aproximado de US\$ 3,67/amostra; o método imunológico, US\$ 7,26/amostra e a PCR, US\$ 3,52/amostra.

Tabela 3. Frequências de detecção de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos nas diferentes etapas de abate obtidas pelos métodos microbiologia convencional, imunológica e PCR, níveis de significância (p) pelo teste Qui-Quadrado (χ^2) e Razão de Chances (OR).

Método	Positivo*	Negativo	χ^2	p	OR (IC: 95%)
Microbiológico	11 ^a	124	-	-	1,00
Convencional					
Imunológica	16 ^b	54	8,72	0,00314	3,34 (1,36 ≤ OR ≤ 8,32)
PCR	27 ^b	63	18,37	0,00002	4,83 (2,13 ≤ OR ≤ 11,15)

* Medidas seguidas da mesma letra não apresentaram diferença significativa pelo método do Qui-Quadrado ($p \leq 0,01$).

Os resultados das Tabelas 2 e 3 mostram a menor sensibilidade do método microbiológico convencional na detecção de *Salmonella* sp. frente aos métodos alternativos de imunológica e PCR.

Para se obter uma melhor comparação dos resultados da pesquisa de *Salmonella* sp. pelos três métodos analíticos, os dados foram agrupados em tabelas de frequência dos resultados coincidentes, tanto positivos quanto negativos, e dos não coincidentes (Tabelas, 4, 5 e 6). Um dado importante de se observar nas três tabelas citadas, é que as maiores porcentagens de resultados coincidentes são encontradas nos resultados negativos, o que, provavelmente se remete à relativa baixa frequência de *Salmonella* sp., encontrada ao longo da linha de abate.

Quanto aos resultados não coincidentes, percebe-se pela Tabela 4, que o número de resultados positivos para a PCR, mas negativos para a microbiologia convencional (24%), supera o contrário, ou seja, resultados negativos para a PCR, mas positivos para

a microbiologia convencional (3%). Este é um dado que reforça a sensibilidade maior da PCR na detecção de *Salmonella* sp. quando comparada com o método convencional.

Tabela 4. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. pelos métodos PCR e microbiologia convencional.

Resultados	Total	Etapas de Abate				
		A	B	C	D	E
Ambos negativos (%)	60 (67)	12 (67)	12 (67)	12 (67)	10 (55)	14 (78)
Ambos positivos (%)	5 (6)	0 (0)	1 (5)	2 (11)	2 (11)	0 (0)
Negativo PCR, positivo convencional (%)	3 (3)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)
Positivo PCR, negativo convencional (%)	22 (24)	5 (28)	5 (28)	4 (22)	5 (28)	3 (17)

Na Tabela 5, a análise dos dados evidencia que o método de imunoanálise foi mais sensível quando comparado ao método convencional com 14 % de resultados positivos para este, mas negativos para o método convencional. A situação oposta, ou seja, resultados positivos para o método convencional, mas negativos para a imunoanálise ocorreu em apenas 1 % das amostras analisadas. Entretanto, é importante destacar que, nos trabalhos de RAES & HENKEN (2000), utilizando amostras fecais derivadas de galinhas, frangos, bezerros e vacas leiteiras, os resultados obtidos pelo sistema immunoanalítico VIDAS[®] apresentaram cerca de 40% de resultados falsos positivos, que não puderam ser confirmados pelo método convencional.

Tabela 5. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. pelo método de imunoanálise e microbiologia convencional.

Resultados	Total	Etapas de Abate				
		A	B	C	D	E
Ambos negativos (%)	53 (76)	10 (71)	9 (64)	12 (86)	8 (57)	14 (100)
Ambos positivos (%)	6 (9)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	3 (21)	0 (0)
Negativo imunoanálise, positivo convencional (%)	1 (1)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Positivo imunoanálise, negativo convencional (%)	10 (14)	3 (21)	3 (21)	1 (7)	3 (21)	0 (0)

O método PCR, quando comparado ao imunoanalítico (Tabela 6), se mostrou mais sensível na detecção de *Salmonella* em carcaças de frango, ao apresentar 23 % de resultados positivos para a PCR, mas negativos para a imunoanálise e 10 % de resultados positivos para este último, mas negativos para a PCR.

Tabela 6. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. pelo método PCR e imunoanálise.

Resultados	Total	Etapas de Abate				
		A	B	C	D	E
Ambos negativos (%)	34 (57)	5 (42)	7 (58)	8 (67)	5 (42)	9 (75)
Ambos positivos (%)	6 (10)	2 (17)	2 (17)	0 (0)	2 (17)	0 (0)
Negativo PCR, positivo imunoanálise (%)	6 (10)	1 (8)	2 (17)	1 (8)	2 (17)	0 (0)
Positivo PCR, negativo imunoanálise (%)	14 (23)	4 (33)	1 (8)	3 (25)	3 (25)	3 (25)

A maior sensibilidade da PCR na detecção de *Salmonella* sp. em diferentes amostras de animais e alimentos, quando comparada à análise microbiológica convencional, já é descrita na literatura, como se pode constatar nos trabalhos de AABO et al. (1993); COHEN et al. (1994); SOUMET et al. (1994 e 1997); BENNETT et al. (1998); GOUWS et al. (1998); MANDRELL & WACHTEL (1999); RYCHLIK et al. (1999); AMAVISIT et al. (2001); SCHRANK et al. (2001); LI & MUSTAPHA (2002); WANG & YEY (2002); WHYTE et al. (2002); OLIVEIRA et al. (2003); UYTENDAELE et al. (2003) e MYINT et al. (2006). Contudo, poucos trabalhos, como o de DICKEL et al. (2005), relataram uma maior eficiência da microbiologia convencional se comparada à PCR.

Para a confirmação do produto de amplificação, uma das amostras positivas para *Salmonella* pela técnica de PCR, a amostra 27D, foi escolhida para seqüenciamento e comparação com demais seqüências disponíveis no GenBank. Este procedimento foi realizado com o objetivo de demonstrar que os produtos de amplificação se correspondiam a seqüências de nucleotídeos pertencentes a microrganismos do gênero *Salmonella*. O alinhamento individual das seqüências apresentou uma identidade que variou de 92% a 99% com as demais seqüências de nucleotídeos pertencentes ao gênero *Salmonella*. No Quadro 1 é mostrada a seqüência parcial de nucleotídeos, correspondente ao gene *invA* de *Salmonella* sp., amplificada por reação de PCR.

```

Tamanho da sequência: 200 bp;
Composição: 38 A; 43 C; 61 G; 58 T; 0 Outro
Porcentagem: 19% A; 22% C; 31% G; 29% T; 0%Outro

Peso Molecular (kDa): ssDNA: 62.02      dsDNA: 123.3
Sequência

1  AGCCTGGCGG TGGGTTTTGT TGTCTTCTCT ATTGTCACCG TGGTCCAGTT TATCGTTATT
61 ACCAAAGGTT CAGAACGCGT CGCGGAAGTC GCGGCCCGAT TTTCTCTGGA TGGTATGCCC
121GGTAAACAGA TGAGTATTGA TGCCGATTTG AAGGCCGGTA TTATTGATGC GGATGCCGCG
181CGCGAACGGC GAAGTGACT

```

Quadro 1. Sequência parcial de nucleotídeos do gene *invA* do isolado de *Salmonella* sp., amostra 27D.

O método imunoanalítico também apresentou maior sensibilidade de detecção de *Salmonella* sp. quando comparado ao método microbiológico convencional. Apesar dos escassos trabalhos na literatura que realizaram esta comparação, WALKER et al (2001), pesquisando amostras de leite, e DE MÉDICI et al (1998), pesquisando amostras de carne de frango, relataram altas correlações entre os resultados do sistema imunoanalítico VIDAS® e a microbiologia convencional. Os autores destacaram algumas vantagens do referido sistema frente à microbiologia convencional como maior rapidez, facilidade e praticidade. DE MÉDICI et al (1998), destacaram ainda que o sistema imunoanalítico pode ser utilizado como um substituto viável para o método tradicional, particularmente para o processamento de produtos de prazo de vida comercial curto, ou quando resultados rápidos são necessários; assim, o sistema poderia ser particularmente vantajoso para a aplicação do APPCC. Os autores ainda consideraram a técnica microbiológica convencional muito demorada e pouco adequada à rotina de monitoramento de grande número de amostras.

Uma outra grande vantagem do sistema imunoanalítico, apesar do relativo maior custo de execução, US\$ 7,26/amostra, é a sua praticidade. Por se tratar de um sistema automatizado, sua operação é muito simples e rápida, o que resulta em economia com mão de obra. A técnica propriamente dita, desconsiderando o pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, despende somente 45 minutos. Portanto, este método se ajusta à rotina de análise de um grande número de amostras como as que podem ser necessárias para um monitoramento correto e efetivo de microrganismos em sistemas de controle de qualidade como o APPCC. A imunoanálise apresenta ainda a vantagem de

analisar de 12 a 60 amostras simultaneamente, proporcionando economia adicional de tempo e trabalho.

Com o intuito de avaliar a contaminação ao longo da linha de abate foram realizadas comparações entre as frequências de detecção de *Salmonella* sp., simultaneamente, entre cada um dos pontos de coleta e entre cada método de pesquisa. De uma forma geral, percebe-se um comportamento de detecção com tendências semelhantes entre os três métodos ao longo da linha de abate (Figura 4).

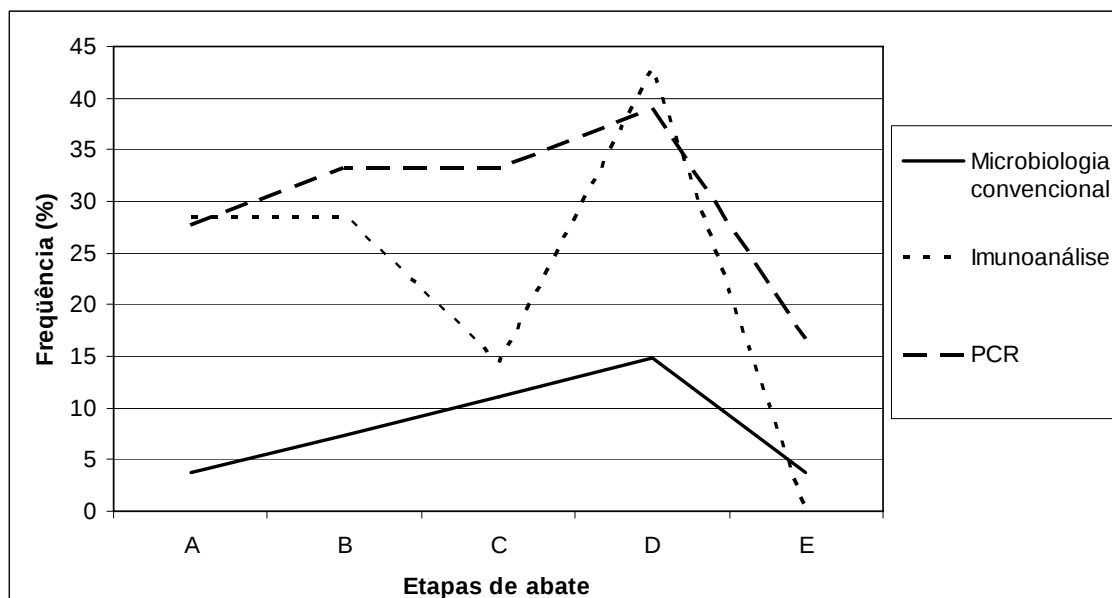


Figura 4. Frequências de detecção de *Salmonella* sp. obtidas pelos três métodos utilizados, ao longo das cinco etapas de abate de frangos.

Etapas de abate

- A: Antes do chuveiro de higienização, após a depenagem.
- B: Após o chuveiro de higienização.
- C: Após a evisceração manual.
- D: Após o chuveiro de lavagem final.
- E: Na saída do pré-resfriamento.

Foi observada uma tendência das amostras analisadas pelos três métodos avaliados apresentarem os maiores valores de contaminação até o ponto D, representado pela etapa após o chuveiro de lavagem final (Figura 4). Exceção foi observada para as amostras coletadas no ponto C, após evisceração manual analisadas pelo sistema imunoanalítico (Figura 4). Estes resultados observados se assemelham aos de LAHELLEC & COLIN (1984) que, utilizando o método convencional, perceberam esta mesma tendência de contaminação ao longo da linha de abate. A frequência alta de *Salmonella* sp. encontrada no ponto D se opõe aos achados de MAY (1974), que

afirmou que a lavagem final, que corresponderia ao ponto D, reduziria as contagens microbianas em frangos.

Os menores valores de frequência de contaminação foram observados no ponto E, que representa amostras coletadas ao final da saída do pré-resfriamento, independente do método de análise utilizado (Figura 4). Este resultado também pode ser constatado ao se observar as Tabelas 4, 5 e 6; uma vez que os resultados negativos coincidentes no ponto E, foram os mais frequentes para cada método de análise.

O maior número de amostras contaminadas observadas nas primeiras fases do abate ocorreram provavelmente em decorrência da manipulação intensa, contaminações cruzadas e provável ineficiência das lavagens intermediárias, conforme destacam SCHINEIDER (1973), TOMAS & MCMEEKIN (1982) e LILLARD (1989). O declínio nas contaminações no ponto E se opõe aos achados de PERIC et al. (1971) e LILLARD (1990), que afirmam que as contaminações microbiológicas após o pré-resfriamento são sempre maiores.

Os resultados também contrariam de uma forma geral, os encontrados por ALMEIDA & SILVA, (1992), que afirmaram que as contaminações bacterianas declinam com a progressão da linha de abate e aumentam no pré-resfriamento.

Esta grande variação de resultados de contaminação por *Salmonella* sp., ao longo da linha de abate se deve sobretudo, à grande variação de padrões de higiene entre os diferentes estabelecimentos de abate de frangos.

A propósito, o sistema APPCC recomenda para que cada estabelecimento industrial defina seus próprios PCC de acordo com as características de instalações, custo, equipamentos e análises microbiológicas efetuadas pelo sistema de controle de qualidade interno do estabelecimento. O ICMSF (1995) define como PCC gerais e recomendados para o abate de frangos, os seguintes: escaldamento; lavagem, após a depenagem; evisceração; lavagem, após a evisceração e o pré-resfriamento.

Com base nos resultados encontrados (Figura 4), conclui-se que, no estabelecimento avaliado, talvez o único ponto que exerça controle sobre o indicador *Salmonella* sp. seja o pré-resfriamento (Ponto E), provavelmente pela manutenção das baixas temperaturas e pela presença de cloro, que é um forte inibidor de crescimento bacteriano. Também por se localizar no final da linha de abate, este ponto representa uma posição estratégica por controlar eventuais falhas de pontos de controle anteriores, tornando um plano APPCC mais viável e econômico, descaracterizando dessa forma os pontos de controle anteriores como críticos. Esta estratégia é muito valorizada na implantação de um plano APPCC.

Existem, no meio científico, discussões controversas à respeito da validade e aplicabilidade da pesquisa de *Salmonella* sp. utilizando-se métodos alternativos como a PCR. Acredita-se que os resultados obtidos por PCR não seriam válidos uma vez que a técnica detecta bactérias do gênero *Salmonella* viáveis ou não. Ou seja, em algumas situações, o método PCR poderia estar detectando bactérias mortas ou injuriadas e que, provavelmente não poderiam causar infecção em um hospedeiro. Contudo, é destacado aqui que o conceito de viabilidade utilizado seria o relacionado à capacidade das bactérias de se multiplicarem em meios de cultura simples. Mas, deve-se considerar que a técnica de PCR utilizada para a pesquisa de *Salmonella* sp., geralmente envolve, um pré-enriquecimento, como no caso do presente trabalho, ou mesmo um enriquecimento seletivo; características que conferem, pelo menos em parte, crescimento bacteriano prévio, conotando viabilidade microbiana. Esta particularidade também é compartilhada pelo método imunoanalítico, uma vez que para a execução deste, são necessários o pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo.

As técnicas de PCR para a detecção de *Salmonella* geralmente envolvem, no mínimo, um pré-enriquecimento para favorecer a recuperação das células com injúrias subletais e aumentar sua população. A etapa de pré-enriquecimento representa aspecto negativo em casos de análises quantitativas (MANDRELL & WACHTEL, 1999). Porém, em se tratando de análises qualitativas, o pré-enriquecimento se constitui em grande vantagem, uma vez que irá aumentar a sensibilidade da técnica, pois a quantidade inicial de DNA alvo estará aumentada. A utilização da técnica de PCR com amostra pré-enriquecida, apesar de apresentar uma sensibilidade um pouco menor quando comparada à amostra advinda do enriquecimento seletivo, apresenta uma sensibilidade superior ao método microbiológico convencional e proporciona vantagens como redução de custo e no tempo de execução da técnica. A técnica de PCR conduzida com amostras submetidas ao pré-enriquecimento seguido de enriquecimento seletivo ganham um incremento no tempo de execução. Segundo o ICMSF (1982), o enriquecimento seletivo é um processo que demanda 24 horas para a execução, que, somados às 24 horas preconizadas para o pré-enriquecimento, somariam 48 horas somente para o preparo das amostras. A extração de DNA pode demorar por volta de 5 horas e a execução propriamente dita da técnica de PCR pode demandar cerca de 4 horas. Partindo de um protocolo que utiliza amostras pré-enriquecidas obtêm-se também redução no custo total com reagentes, vidraria e mão de obra. Vale destacar que a principal vantagem da execução de técnicas alternativas como PCR se reside no fato de

esta fornecer resultados, em curto intervalo de tempo, como relatado nos trabalhos de MYINT et al. (2006).

Um outro fator que reforça a aplicabilidade da utilização da PCR na rotina de monitoramento é seu custo, US\$ 3,52/amostra, que é praticamente o mesmo do método convencional oficial, US\$ 3,67/amostra.

Por serem métodos alternativos, os métodos PCR e imunoanalítico sempre serão comparados à microbiologia convencional, que é considerada a referência de diagnóstico de sorotipos viáveis de *Salmonella* sp., uma vez que somente pelo crescimento e multiplicação é que são detectadas as colônias e é obtido o resultado.

Vários trabalhos já descreveram a utilização da PCR como método para pesquisa de patógenos em indústrias manipuladoras de alimentos e sua utilização é cada vez mais aceita pela comunidade científica. Acredita-se que o grande entrave para a utilização de métodos alternativos como a PCR e o imunoanalítico, seja o legal, uma vez que hoje, o único método reconhecido como oficial pelo Ministério da Agricultura para a pesquisa de *Salmonella* sp. é a microbiologia convencional.

5- CONCLUSÃO

Os métodos alternativos, PCR e imunoanálise foram mais sensíveis, práticos e rápidos na detecção de *Salmonella* sp. no abate de frangos se mostrando vantajosos em relação ao convencional, podendo serem selecionados como ferramenta de monitoramento para o programa de qualidade APPCC. O método imunoanalítico apresentou a desvantagem de possuir um custo relativamente maior, mas isso poderia ser compensado pela economia de tempo, trabalho e pela grande escala amostral. A PCR apresentou custo praticamente idêntico ao método convencional.

Verificou-se um comportamento de contaminação semelhante entre as primeiras quatro fases de abate, destacando a diminuição da contaminação na última fase, situada na saída do pré-resfriamento. A baixa frequência do patógeno encontrada neste ponto caracterizou-o como um ponto crítico de controle (PCC) na implementação de um eventual plano APPCC no estabelecimento pesquisado. Este ponto também foi considerado como tal, por apresentar uma característica estratégica, a de se localizar no final da linha de abate, o que dispensaria a existência de outros PCC anteriores.

Os resultados encontrados pelos métodos PCR e imunoanalítico, foram considerados aprovados pela maior sensibilidade destes e por requererem pelo menos um pré-enriquecimento prévio das amostras, indicando viabilidade de *Salmonella* sp nestas.

ANEXO

Anexo 1. Resultados da pesquisa de *Salmonella* sp. obtidos pelo método microbiológico convencional por amostra e etapas de abate.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-
22	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	+	+	+
25	-	-	-	-	-
26	-	+	+	-	-
27	+	-	-	+	-
Total	1	2	3	4	1
%	3,7	7,4	11,1	14,8	3,7

Anexo 2. Resultados da pesquisa de *Salmonella* sp. obtidos pelo método imunológico por amostra e etapas de abate.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	+	-	+	+	-
18	-	-	-	+	-
19	-	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	-
22	-	+	-	+	-
23	-	-	-	-	-
25	+	+	-	+	-
26	-	-	+	-	-
27	+	+	-	+	-
Total	4	4	2	6	0
%	28,6	28,6	14,3	42,8	0

Anexo 3. Resultados da pesquisa de *Salmonella* sp. obtidos pela reação da polimerase em cadeia (PCR) por amostra e etapas de abate.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-
11	-	+	-	-	-
12	-	+	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	+	-	-	-
15	+	-	-	+	-
16	-	-	+	-	-
17	-	-	-	-	-
18	+	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-
24	-	-	+	+	-
25	+	+	-	-	+
27	-	-	+	+	+
Total	5	6	6	7	3
%	27,7	33,3	3,33	38,9	16,7

Anexo 4. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. por amostra e pelos métodos PCR e microbiologia convencional.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+, -	-
7	-	+, -	+, -	+, -	-
11	-	+, -	-	-	-
12	-	+, -	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	+, -	-	-	-
15	+, -	-	-	+, -	-
16	-	-	+, -	-	-
17	-	-	-	-	-
18	+, -	-	-	+, -	-
20	-	-	-	-	-
21	+, -	+	+, -	+, -	+, -
22	-	-	-	-, +	-
23	+, -	-	-	-	-
24	-	-	+	+	-, +
25	+, -	+, -	-	-	+, -
27	-, +	-	+, -	+	+, -

Anexo 5. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. por amostra e pelos métodos imunológico e microbiologia convencional.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	+, -	-	+, -	+, -	-
18	-	-	-	+, -	-
19	-	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-
21	+, -	+	-	-	-
22	-	+, -	-	+	-
23	-	-	-	-	-
25	+, -	+, -	-	+, -	-
26	-	-, +	+	-	-
27	+	+, -	-	+	-

Anexo 6. Resultados coincidentes da pesquisa de *Salmonella* sp. por amostra e pelos métodos PCR e imunonalítico.

Amostra	Etapas de Abate				
	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-
14	-	+, -	-	-	-
15	+, -	-	-	+, -	-
16	-	-	+, -	-	-
17	-, +	-	-, +	-, +	-
18	+, -	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-
21	+	+	+, -	+, -	+, -
22	-	-, +	-	-, +	-
23	+, -	-	-	-	-
25	+	+	-	+, -	+, -
27	+, -	-, +	+, -	+	+, -

BIBLIOGRAFIA

- AABO, S.; RAMUSSEN, O.F.; ROSSEN, L.; SERENSON, P.D.; OLSEN, J.E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular Cell Probes**, n. 7, p. 171–178, 1993.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO - ABEF. **Estatísticas. Mercado Mundial**. Disponível em <http://www.abef.com.br/>. Acessado em 25/04/2006.
- ALMEIDA, P. F.; SILVA, E. N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 2, p. 105-120, 1992.
- AMAVISIT, P.; BROWNING, G.F.; LIGHTFOOT, D.; CHURCH, S.; ANDERSON, G.A.; WHITHEAR, K.G.; MARKHAM, P. F. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse fecal samples. **Veterinary Microbiology**, n. 79, p. 63–74, 2001.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Proceedings of the 1971 Nacional Conference on Food Protection**. Food and Drug Administration (USA), 1972.
- ANGULO, F. J.; VOETSCH, A. C.; VUGIA, D.; HADLER, J. L.; FARLEY, M.; HEDBERG, C.; CIESLAK, P.; MORSE, D.; DWYER, D.; SWERDLOW, D. L. Determining the burden of human illness from food borne diseases. CDC's emerging infectious disease program Food Borne Diseases Active Surveillance Network (Food-Net). **Veterinary Clinical North And Food Animal Practice**, n. 14, p. 165–72, 1998.
- AVISITE. URL: <http://www.avisite.com.br/>. Acessado em 25/04/2006.
- BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella* enterica with primers specific for *iroB*. **Journal of Clinical Microbiology**, n.35, p. 1224–1230, 1997.
- BELI, E.; DURAKU, E.; TELO, A. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albânia. **International Journal of Food Microbiology**, n.71, p. 263–266, 2001.
- BENNETT, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters of Applied Microbiology**, n. 26, p. 437–441, 1998.
- BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1ª ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984, 964 p., v. 1.
- BICHLER, L. A.; NAGARAJA, K. V.; POMEROY, B. Plasmid Diversity in *Salmonella* enteritidis of Animal, Poultry and Human Origin. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 1, p. 4-11, 1994.
- BIOLAB-MÉRIEUX S. A. **Manual Sistema VIDAS® e MINI-VIDAS®**, Estrada do Mapuá 491 – Jacarepaguá – RJ – Brasil, CEP: 22710-261. s. d.
- BLAST - Basic Alignment Search Tool. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. **National Institute of Health-NCBI**. Acessado em 22/06/2006.
- BOER E.; ZEE H. V. *Salmonella* in foods of animal origin in the Netherlands, In: *Salmonella AND SALMONELLOSIS SYMPOSIUM*, Ploufragan, France, 1992. p. 265-271.
- BORLAND, E. D. *Salmonella* infection in poultry. **The Veterinary Records**, v. 97, p.406-408, 1975.
- BOURLET, T.; PRETIS, C.; PILLET, S.; LESENECHAL, M.; PICHE, J.; POZZETTO, B. Comparative evaluation of the VIDAS HIV DUO Ultra assay for combined detection of HIV-1 antigen and antibodies to HIV. **Journal of Virological Methods**, n. 127, p. 65–167, 2005.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 04/09/1997. Regulamento Técnico sobre as condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, 08/09/1997, Seção 1, p. 19697, 1997.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46 de 10/02/1998. Manual genérico de procedimento para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 16/03/1998, Seção 1, p. 24, 1998a.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10/11/1998. Regulamento Técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 26/11/1998, Seção 1, p. 226 1998b.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. Aprovado pelo decreto 30.691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1.255 de 25/06/1962. Brasília, Ministério da Agricultura, 1980.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, 18/09/2003, Seção 1, p. 14, 2003a.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70 de 06/10/2003. Programa de redução de patógenos: monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella spp.* em carcaças de frangos e perus. **Diário Oficial da União**, 10/10/2003, Seção 1, p. 9, 2003b.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. **Microbiologia Médica**. 20ªed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Direitos Reprográficos, Guanabara Koogan, 1998. 524p.
- BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Health Risks and Consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 326-344, 1995.
- BUFFONE, G. J.; DEMMLER, G. J.; SCHIMBOR, C. M.; and GREER, J. Improved amplification of cytomegalovirus DNA from urine after purification of DNA with glass beads. **Clinical Chemistry**, n. 37, p.1945-1949, 1991.
- CAPITA, R.; ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCIA-FERNANDEZ, M. C. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology** n. 81, p. 169– 173, 2003.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL S. M. **A Célula**, Editora Manole Ltda, 2001. 287p.
- CASTILLA, K. S. **Deteção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de Salmonella Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. São Paulo, SP: USP, 2003. 77p. Dissertação para o título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- CERRO, A. DEL.; SOTO S. M.; ANDERAS, E. L.; GONZALEZ-HEVIA M. A.; GUIJARRO, J. A.; MENDOZA, M. C. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. **Food Microbiology**, n. 19, p. 567-575, 2002.
- CHIU, CH.; OU, J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 34, p. 2619-2622, 1999.

- COHEN, N. D.; MCGRUDER, E. D.; NEIBERGS, H. L.; BEHLE, R. W.; WALLIS, D. E.; HARGIS, B. M. Detection of *Salmonella* enteritidis in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. **Poultry Science**, n. 73, p. 354–357, 1994.
- COSTA, F. N. **Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos**. Unesp-Jaboticabal, SP: 1996. 71p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1996.
- COTTA, TADEU. **Frangos de Corte: Criação, Abate e Comercialização**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 238p.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, n. 24, p. 11–31, 1994.
- DE MEDICI, D., PEZZOTTI, G., MARFOGLIA, C., CACIOLO, D., FOSCHI, G., OREFICE, L. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology** n. 45, p. 205–210, 1998.
- DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F. M.; DUARTE, L. F. Microbiologia convencional, ELISA, e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 79-85, 2005.
- DOYLE, M. P. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 185-204.
- DUFFEY, P. S.; KANI, J. C.; LEE, J. O.; HILL, W. J.; KOKKA, R. *Salmonella* serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3 (Kappa) monoclonal antibody (321-1-E3) reactive with a somatic factor 8-like polysaccharide antigen. **Journal of Clinic Microbiology** n. 30, p. 3050-3057, 1992.
- DUGUID, J. P.; NORTH, R. A. E. Egg and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 34, p. 65-72, 1991.
- ELLERBROEK, L. Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. **Food Microbiology**, n. 14, p. 527–531, 1997.
- FACH, P.; DILASSER, F.; GROUT, J.; TACHE, J. Evaluation of a polymerase chain reaction-based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples: probelias *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, n. 62, p. 1387-1393, 1999.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Tradução de Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A. 2002.
- GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology** n.174, p. 4338-4349, 1992.
- GARRETT, C. T; FERREIRA-CENTENO, A.; NASIN, S. Molecular diagnostics: issues of utilization, regulation and organization. **Clinical Chemistry**. Acta 217, p. 85-103, 1993.
- GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. Ed. CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**. 10th. Ames: Iowa University Press. 1997. p.97-122.
- GAST, R. K.; MITCHELL, B. W.; HOLT, P. S. Airbone transmission of *Salmonella* enteritidis infection between groups of chicks in controlled-environment isolation cabinets. **Avian Diseases**, v.42, n. 2, p. 315-320, 1998.

- GIESSEN, A. W.; DUFRENNE, J. B.; RITMEESTER, W. S.; BERKERS, P. A. T. A.; LEEUWEN, W. J.; NOTERMANS, S. H. W. The identification of *Salmonella* enteritidis-infected poultry flocks associated with an outbreak of human salmonellosis. **Epidemiological Infections**, n.109, p. 405-411, 1992.
- GOUWS, P.A.; VISSER, M.; BROZEL, V.S. A Polymerase Chain Reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 h. **Journal of Food Protection**, n. 61, p. 1039-1042, 1998.
- GRUENEWALD, R.; BLUM, S.; CHAN, J. Relationship between human immunodeficiency virus infection and salmonellosis in 20 to 59 Year Old Residents of New York City. **Clinical Infections Diseases**, v. 18, p. 358-363, 1994.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.
- HOGUE, A. T.; WHITE, R. L.; HEMINOVER, J. A. Pathogen reduction and hazard analysis and critical control point (HACCP) systems for meat and poultry. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, n. 14, p. 151-162, 1998.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **HACCP in Microbiological Safety and Quality, Microorganisms in Foods**. Blackwell Science, 1995. 357 p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETES – ICMSF. **Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico**. 2. ed. Zaragoza, Acribia, 1982. v. 1.
- ISLAM, M, A.; HEUVELINK, A. E.; TALUKDER, K. A.; BOER, E. D. A Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal feces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. **International Journal of Food Microbiology**, 2006.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**; Trad. Eduardo Cesar Tonto [et al.] 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- KIMURA, B.; KAWASAKI, S.; FUJII, T.; KUSUNOKI, J.; ITOH, T.; FLOOD, S. J. A. Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. **Journal of Food Protection**, n. 62, p. 329-335, 1999.
- KWANG, J.; LITTLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Letters of Applied Microbiology**, n. 22, p. 46-51, 1996.
- LAHELLEC, C.; COLIN, P. Influence of processing on *Salmonella* contamination of poultry carcass; Possibilities of improvement. In INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *Salmonella*, 1984, New Orleans, Louisiana, USA: **Proceedings**...1984, p. 249-256.
- LANDERAS, E.; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M.C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. **International Journal of Food Microbiology**, n. 43, p. 81-90, 1998.
- LEITÃO, M. F. F. Segurança alimentar na cadeia de produção de frangos. In: **2º Simpósio técnico sobre matrizes de frangos de corte**. Chapecó, Brasil. p. 28-30. 1999. Chapecó.

- LEON-VELARDE, C. G.; CAI, H. I.; A, LARKIN, C.; BELL-ROGERS, P.; STEVENS, R. W. C.; ODUMERU, J. A. Evaluation of methods for the identification of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium DT104 from poultry environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, n. 58, p. 79– 86, 2004.
- LI, Y.; MUSTAPHA, A. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. **Letters of Applied Microbiology**, n. 35, p. 508–512, 2002.
- LILLARD, H. S. Comparision of sampling methods and implications for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 405-408, 1988.
- LILLARD, H. S. Determination of the stage in broiler processing where firm bacterial attachment first occur. In: 78TH ANN. MEETING OF THE POULTRY SCIENCE ASSOCIATION INC., 78, 1989, USA: **Abstracts...**1989. p. 190. Poultry Science v. 68, p. 190, 1989.
- LILLARD, H. S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 202-204, 1990.
- MANDRELL, R. E.; WACHTEL, M. R.; Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. **Current Opinion on Biotechnology**, n. 10, p. 273-278, 1999.
- MAY, K. N. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercially slaughtered broilers. **Poultry Science**, v. 953, p. 1282-1285, 1974.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, n. 5, p. 607–25, 1999.
- MILDVAN, D.; MATHUR, U.; ENLOW, R. W.; ROMAIN, P. L.; WINCHESTER, R. J.; COLP, C.; SINGMAN, H.; ADELSENBERG, B.; SPIGLAND, I. Opportunistic Infections and Immune in Homosexual Men. **Annals of Internacional Medicine**, v. 96, n.1, p. 700-704, 1982.
- MOORE, J. E.; MURRAY, L.; FANNING, S.; CORMICAN, M.; DALY, M.; DELAPPE, N.; MORGAN, B.; MURPHY, P. G. Comparison of phenotypic and genotypic characteristics of *Salmonella* bredeney associated with a poultry-related outbreak of gastroenteritis in Northern Ireland. **Journal of Infection**, n.47, p. 33– 39, 2003.
- MULDER, R. W. A. W.; DORRESTEIJN, L. W. J.; VAN DER BROEK, J. Crosscontamination during the scalding and plucking of broilers . **Brazilian Poultry Science**, v. 19, p. 61-70, 1978.
- MULLIS, K. B.; FALLONA, F.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. In: COLD SPRING HARBOR SYMP. **Quantitative Biology**. New York: v. 51, p. 263-273, 1986.
- MYINT, M. S.; JOHNSONA, Y. J.; TABLANTEA, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, n. 23, p. 599–604, 2006.
- NGUYEN, A. V.; KHAN, M. I.; LU, Z.; Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, n. 38, p. 119-126, 1994.
- OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; CE, M.C.; ROCHA, S.L.S.; CANAL, C.W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters of Applied Microbiology**, n. 36, p. 217–221, 2003.

- PANISELLO, P. J.; ROONEY, R.; QUANTIC, P. C.; STANWELL-SMITH, R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal of Food Microbiology** n. 59, p. 221-234, 2000.
- PERIC, G. A.; ROSSAMNITH, E.; LEISTNER, L. Investigations into the influence of spin chiller cooling on the surface bacterial content of poultry. **Die Fleischwirtschaft**, v. 51, p. 216-218, 1971.
- PERSING, D. H. polymerase chain reaction: trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology** n.29, p. 1281-1285, 1991.
- PLUMMER, R. A. S.; BLISSETT, S. J.; DODD, C. E. R. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the UK. **Journal of Food Protection**, n. 58, p. 843–846, 1995.
- POPOFF, M. Y.; BOCKMÜEL, J.; BRENER, F. W. Supplement 1997 (n. 41) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 149, p. 601-604, 1998.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. L. Antigenic formulas of *Salmonella* servars. In: **National Salmonella Center by the WHO collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Paris: Institute Pasteur, 1997.
- POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis In: SAEED, A. M.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Ames: **Iowa State University Press**, 1999. p. 3-18.
- POPPE, C. *Salmonella* Enteritidis in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, n.21 p.1-5, 1994.
- RAES, M.; HENKEN, A. M. RIVM report 284500 015 - **Report on the fourth workshop organised by CRL-Salmonella**. Bilthoven, the Netherlands, 2000, 53 p.
- RAHN, K.; DE GRANTIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWEN, GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III, R. and GYLES, C. L. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes** n. 6, p. 271-279, 1992.
- RAMAMURTHY, T.; PAL, A.; BAG, P. K.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G. B.; KUZORANO, H.; YAMASAKI, S.; SHIRAI, H.; TAKEDA, T.; UESAKA, Y.; HORIGONE, K. and TAKEDA, Y. Detection of cholera toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholera. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 31, p. 3068-3070, 1993.
- RAMPLING, A.; UPSON, R.; PETERS, E.; ANDERSON, J. R.; WARD, L. R.; ROWE, B. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **Lancet**, n. 14, p. 436-438, 1989.
- RASZL, S. M.; ORE, N. D.B.; CUELLAR, J. A.; ALMEIDA, C. R. **HACCP: Instrumento Essencial para a Inocuidade de Alimentos**. Instituto Pan-Americano de Proteção de Alimentos. 2001. 333p.
- RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella* enteritidis: a new pandemic? **Epidemiological Infections**, n. 105, p.21-27, 1990.
- RYAN, M. J.; WALL, P. G.; ADAK, G. K.; EVANS, H. S.; COWDEN, J. M. Outbreaks of Infectious Intestinal Disease in Residential Institutions in England and Wales 1992-1994. **Journal of Infection**, n. 34, p. 49-54, 1997.
- RYCHLIK, I.; VAN KESTEREN, L.; CARDOVA, L.; SVESTKOVA, A.; MARTINKOVA, R.; SISAK, F. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. **Letters of Applied Microbiology**, n. 29, p. 269–272, 1999.

- SAKAI, T.; CHALERMCHAIKIT, T. The major sources of *Salmonella* enteritidis in Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, n.31, p. 173-180, 1996.
- SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach** Illinois: ASM Press, 1994. 418p.
- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, n. 29(2), p. 87-92, 2001.
- SCHIMID, H.; BAUMGARTNER, A. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Switzerland: Recognition, Development, and control of the Epidemic. In: SAEED, A.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Ames: **Iowa State University Press**, 1999. p. 81-91.
- SCHINEIDER, I. S. **Processamento Industrial de aves e seus subprodutos**. Editora Brasileira da Agricultura S. A. São Paulo, SP, 1973. 100p.
- SCHRANK, I. S.; MORAES, M. A. Z.; COSTA, J. L. A.; FRAZZON, A. P. G.; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology** n. 82, p. 45-53, 2001.
- SCUDERI, G. Epydemiology of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infections in Italy. In: SAEED, A.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Ames: **Iowa State University Press**, 1999. p. 111-115.
- SCUDERI, G.; FANTASIA, M.; FILETICI, E.; ANASTASIO, M. P. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. **Epidemiological Infections**, n. 116, p. 257-265, 1996.
- SHACKELFORD, A. D. Modification of processing methods to control *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, n. 67, p. 933-935, 1988.
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; SALVAT, G.; COLIN, P. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. **Letters of Applied Microbiology**, n. 24, p. 113-116, 1997.
- SOUMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters of Applied Microbiology**, n. 19, p. 294-298, 1994.
- STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32, p. 1742-1749, 1994.
- TAKAHASHI, T.; KOEHLER, J.; SWENSON, P.; DUCHIN, J. Evaluation of a public health *Salmonella* surveillance system in King County, Washington. **Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology Inc.** Seattle, Washington, 2004.
- TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem os salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-127, 1996.
- TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 38(5):315-332, 1996.

- THIEL, W. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Phage Type in Austria: From Understanding to Intervention. In: SAEED, A.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. Ames: **Iowa State University Press**, 1999. p. 91-109.
- THOMASON, B. M. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. **Applied Microbiology** n. 22, p.1064-1069, 1971.
- TOMAS, C. J.; McMEEKIN, T. A. Effect of water immersion on the microtopography of the skin of chicken carcasses. **Journal of Science Focusing Agriculture**. v. 33, p. 549-554, 1982.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBA. **Estatísticas. Mercado Interno**. Disponível em <http://www.uba.org.br/>. Acessado em 25/04/2006.
- UYTTENDAELE, M. R.; DEBEVERE, J. M.; LIPS, R. M.; NEYTS, K. D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, n. 40, p. 1– 8, 1998.
- UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters of Applied Microbiology**, n. 37, p. 386–391, 2003.
- VANETTI, M. C. D. Microorganismos patogênicos em leite. IN: Editado [por] Regina Célia Santos Mendonça... [e outros]. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa – MG: Tribuna Editora Gráfica, 2003. p. 49-56.
- VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **Journal of Microbiological Methods**. n. 40, p. 47–151, 2000.
- WALDROUP, A. L. Contamination of raw poultry with pathogens. **World's Poultry Science Journal**. v. 52, p. 07-26. 1996.
- WALKER, R. L.; KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, n.67, p. 123–129, 2001.
- WANG, S.-J.; YEH, D.-B. Designing of polymerase chain reaction primers for the detection of *Salmonella* Enteritidis in foods and fecal samples. **Letters of Applied Microbiology**, n. 34, p. 422–427, 2002.
- WARD, L. R.; THRELFALL, E. J. Human salmonellosis in England and Wales - current situation, In: *Salmonella AND SALMONELLOSIS SYMPOSIUM*, 1997, Ploufragan, França, p. 547-9.
- WAY, J. S.; JOSEPHSON, K. L.; PILLAI, S. D.; ABBASZADAGAN, M.; GESBA, C. P.; PEPPER, I. L.. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, n. 39, p. 1473-1479, 1993.
- WHYTE, P.; Mc GILL, K.; COLLINS, J. D; GORMLEY, E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology** n.89, p. 53-60, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002. **Food Safety: A resolution of the executive board of the World Health Organization** - Resolution EB105. R16. <http://www.who.int/en/>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **EPI INFO. Database and statistics software for public health professionals**. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Versão: 26/4/2004

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.;
FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of *Salmonella* typing Public health
perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p.189–204, 2003.