

BEATRIZ GARBELOTTI MATIAS

**CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE CARÇAÇAS DE FRANGOS OBTIDAS
EM DOIS SISTEMAS DE ABATE E AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE
REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE
Salmonella SPP.**

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
mestre *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

T

M433c
2008

Matias, Beatriz Garbelotti, 1980-

Contaminação microbiana de carcaças de frangos obtidas em dois sistemas de abate e avaliação de um protocolo de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. / Beatriz Garbelotti Matias.

– Viçosa, MG, 2008.

ix, 67f.: il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Carne de ave - Controle de qualidade. 2. *Salmonella* spp.
3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Microorganismo -
Indicadores. 5. Alimentos - Microbiologia. 6. Carne -
Inspeção. 7. Indústria avícola. 8. Matadouros - Inspeção.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

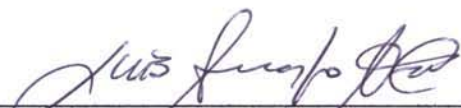
CDD 22.ed.

BEATRIZ GARBELOTTI MATIAS

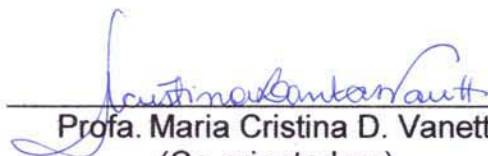
**CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE CARÇAÇAS DE FRANGOS OBTIDAS
EM DOIS SISTEMAS DE ABATE E AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE
REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE
Salmonella SPP.**

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.

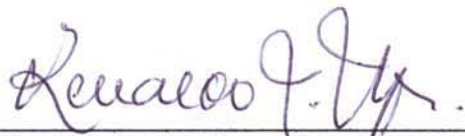
APROVADA: 19 de dezembro de 2008.



Prof. Luis Augusto Nero
(Co-orientador)



Profa. Maria Cristina D. Vanetti
(Co-orientadora)



Prof. Renaldo Travassos Martins



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin



Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

E mais dois anos se foram...

...e tantas pessoas me acompanharam nesta jornada...

...algumas apenas atravessaram, outras sonharam junto comigo desde o início e outras, se tornaram companheiras ao longo desse caminho...

Obrigada,

Papito e Mamita pelo eterno amor...

Pisci, Deião, Carol, Cris, Oscarito, Joãozinho, Fernanda, Abe, Orlando, Andrezão, Sérgio e Albanno, pela maravilhosa amizade...

Professores do DVT que contribuíram na minha formação profissional...

Orientador e co-orientador Paulo e Nero, pelo apoio, paciência e pelos ensinamentos...

Professora e co-orientadora Cristina Vanetti, pela oportunidade de conhecer uma valiosa professora e pelo incentivo profissional...

Funcionários do DVT, Dagô, Luis, Marquinho, Monteiro que me socorreram em algumas horas...

Meus estagiários, Aline, Letícia, Fran, Mococa que foram indispensáveis e exemplares...

Colegas do laboratório de Inspeção, Gabriela, Japa, Bia, Luana, Paulinha, Rodrigo e Michelle pela colaboração e convivência...

Professora Márcia Rogéria, pelo incentivo e pela disponibilidade do Laboratório de Infectologia Molecular Animal...

Colegas do LIMA, pela atenção e apoio...

Motoca, por me levar a todos os lugares a qualquer hora que precisei...

Minha gata Quitéria, por sempre me fazer companhia...

Beth, pela amizade e pelas aulas divertidas de Inglês...

Vanilda, por me dar suporte psicológico todos esses anos...

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão do suporte financeiro...

UFV e a Viçosa, por me proporcionarem toda essa conquista...

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Controle de qualidade.....	2
2.2. <i>Salmonella</i> spp.	7
2.3. Métodos de diagnóstico.....	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
OBJETIVOS.....	23
CAPITULO 1. <i>Salmonella</i> spp. e microrganismos indicadores de higiene em carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas de processamento em dois abatedouros.	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Coleta de amostras e diluições	28
2.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	28
2.3. Pesquisa de indicadores de higiene	29
2.4. Monitoramento de temperatura e concentrações de cloro no processamento	30
2.5. Análise dos resultados	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4. AGRADECIMENTOS.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CAPITULO 2. Avaliação de um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de <i>Salmonella</i> spp. diretamente de amostras superficiais de carcaças de frangos e de caldo de pré-enriquecimento.	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Amostragem e delineamento experimental	45
2.2 Microbiologia Convencional - <i>Salmonella</i> spp.	45
2.3. Metodologia alternativa - Reação em Cadeia da Polimerase	46
2.4. Análise dos resultados	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. REFERÊNCIAS	55
CONCLUSÕES.....	60
ANEXOS.....	61
Anexo 1. Resultados de análises microbiológicas de amostras superficiais de carcaças de frangos coletadas em abatedouro de pequeno porte (Ab2).	62
Anexo 2. Concentrações de cloro livre residual em conteúdo de tanques de resfriamento avaliados em abatedouro de aves de pequeno porte (Ab2).	67
Anexo 3. Temperaturas (°C) em diferentes etapas do processamento de carcaças de frangos em abatedouro de aves de pequeno porte (Ab2).	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1. Gel de eletroforese com os produtos de amplificação obtidos pela Reação em Cadeia da Polimerase de seis culturas de *Salmonella* spp. (1 a 6) isoladas de amostras superficiais de carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas de processamento de um abatedouro de pequeno porte (Ab2). Marcador molecular de 100-bp da Promega (Promega Co., Madison, WI, USA) (M); *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controle positivo (+) com um segmento de 284-pb; água Milli-Q como controle negativo (-)..... 31
- Figura 2. Variação da concentração de cloro residual livre em tanques de pré-resfriamento (pré-chiller, ▲) e do resfriamento (chiller, ○) obtidos no abatedouro de pequeno porte (Ab2). 34
- Figura 3. Variação de temperaturas mensuradas em diferentes etapas do processamento (A: escaldagem, B: pré-resfriamento e C: resfriamento) e interior de carcaças de frangos (D) durante coletas de amostras em abatedouro de pequeno porte (Ab2). Em cada gráfico, pontos indicam as temperaturas mensuradas e as linhas contínuas indicam os valores mínimos (em A) e máximos (em B, C e D) de referência (Brasil, 1998b)..... 35

CAPÍTULO 2.

- Figura 1. Gel de eletroforese com produtos de amplificação obtidos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de caldos de pré-enriquecimento semeados com amostras superficiais de carcaças de frangos, antes (1A e 22A) e após (4C, 18A, 18B, 18C, 19A, 19B, 19C, 20B, 21A, 23A, 24A, 24B, 24C, 25B, 25C, 25D) incubação a 37 °C por 20 h. Marcador molecular de 100-bp da Promega (Promega Co., Madison, WI, USA) (M); *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controle positivo (+) com um segmento de 284-pb; água Milli-Q como controle negativo (-)..... 49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1.

- Tabela 1. Freqüências de *Salmonella* spp. em diferentes etapas de processamento em abatedouro de grande (Ab1) e pequeno porte (Ab2)..... 31
- Tabela 2. Médias (\pm desvio padrão) dos valores de contaminação por aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* em quatro etapas do processamento de frangos no abatedouro de grande (Ab1) e pequeno (Ab2) porte..... 32

CAPÍTULO 2.

- Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos e confirmação de isolados de *Salmonella* spp. obtidos pela metodologia convencional..... 47
- Tabela 1. Freqüências de resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos obtidos pela metodologia convencional de isolamento (MC) e um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase diretamente das amostras (PCR-A) e do caldo de pré-enriquecimento antes (PCR-PE) e após (PCR-PEI) incubação a 37 °C por 20 h. 48
- Tabela 2. Níveis de significância (P) obtidos pelo teste de McNemar para verificação de diferenças significativas entre metodologias de detecção de *Salmonella* spp. (Metodologia convencional, MC, e reação da cadeia de polimerase diretamente das amostras, PCR-A, e de caldos de enriquecimento antes, PCR-PE, e após, PCR-PEI, incubação a 37 °C por 20 h) em amostras superficiais de carcaças de frangos. 49
- Tabela 3. Resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos por um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) diretamente das amostras (PCR-A) e de caldos de pré-enriquecimento antes (PCR-PE) e após (PCR-PEI) incubação a 37°C por 20h, considerando a metodologia convencional (MC) como referência para cálculo de taxas de desempenho..... 50

RESUMO

MATIAS, Beatriz Garbelotti, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2008. **Contaminação microbiana de carcaças de frangos obtidas em dois sistemas de abate e avaliação de uma metodologia de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp.** Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Luís Augusto Nero.

O controle de qualidade em indústrias alimentícias é uma exigência mundial, e em abatedouros de aves é conduzido basicamente pelo monitoramento de microrganismos indicadores de higiene e patógenos em pontos específicos da linha de processamento. Essa necessidade demanda o desenvolvimento e aplicação de metodologias rápidas e confiáveis a fim de serem utilizadas no controle de qualidade. Neste estudo foram avaliadas as diferenças na contaminação microbiana em carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas do processamento em dois abatedouros (Ab1, classificados como de grande porte e Ab2, de pequeno porte). Ainda, uma metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. foi comparada com a metodologia convencional (MC). Amostras superficiais de carcaças de frangos foram coletadas nas seguintes etapas: A) imediatamente antes da evisceração, B) após a evisceração, C) após o chuveiro, e D) após o tanque de resfriamento (chiller). Todas as amostras coletadas foram submetidas à pesquisa de bactérias indicadoras de higiene (aeróbios mesófilos - AM, coliformes totais - CT, coliformes termotolerantes - CTT e *Escherichia coli* - EC) e *Salmonella* spp. A pesquisa de *Salmonella* spp. por PCR foi realizada diretamente das amostras (PCR-A), do caldo do pré-enriquecimento recém-semeado (PCR-PE) e do caldo de pré-enriquecimento após incubação (PCR-PEI). Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências de *Salmonella* spp. obtidas pela MC em diferentes etapas do processamento em Ab1 e Ab2 ($P > 0,05$). Verificou-se maior contaminação em Ab2 em relação a Ab1 por AM (nas etapas B e D), CT e CTT (etapa D) e EC (todas as etapas) ($P < 0,05$). Em relação à metodologia de PCR avaliada, verificou-se maior sensibilidade da PCR-PEI em relação às demais variações (PCR-A e PCR-PE), porém não se constatou diferença significativa com a MC ($P > 0,05$). Os resultados obtidos indicam a importância de diferentes etapas do processamento na contaminação microbiana de carcaças de frangos em diferentes sistemas de abate e a necessidade de avaliação de metodologias alternativas a serem utilizadas na pesquisa de *Salmonella* spp.

ABSTRACT

MATIAS, Beatriz Garbelotti, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2008. **Microbiological control in chicken carcasses from two slaughter systems and evaluation of a Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology for *Salmonella* spp. detection.** Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Luís Augusto Nero.

The quality control in food industries is a global requirement, and in chicken slaughtering is conducted primarily through monitoring of hygiene indicator microorganisms and pathogens in specific processing steps. This need requires the development and application of rapid and reliable methods to be used in quality control. This study evaluated the differences in the microbiological contamination of chicken carcasses obtained at different processing steps from two distinct slaughterhouses (Ab1, classified as large-scale, and Ab2, small-scale). Still, a PCR methodology for detection of *Salmonella* spp. was compared to the conventional method (CM). Surface samples of chicken carcasses were collected in the following sequential steps: A) immediately before evisceration, B) after evisceration, C) after showering and D) after a cooling tank (chiller). All samples were tested for microbiological hygiene indicators (mesophilic aerobes - MA, total coliforms - TC, thermotolerant coliforms - TTC and *Escherichia coli* - EC) and *Salmonella* spp. In addition, *Salmonella* spp. was detected by PCR directly from the sample (PCR-S), from the pre-enrichment broth immediately after inoculation (PCR-PE) and from pre-enrichment broth after incubation (PCR-PEI). No significant differences were observed between the frequencies of *Salmonella* spp. obtained at different steps in Ab1 and Ab2 ($P > 0.05$). Ab2 showed higher levels of microbiological contamination in different steps of processing when compared to Ab1, for MA (in B and D steps), TC and TTC (D step) and EC (all steps) ($P < 0.05$). Regarding PCR, PCR-PEI showed higher sensitivity when compared to PCR-S and PCR-PE, despite the absence of significant difference when compared to the CM ($P > 0.05$). The results indicate the significance of different processing steps during slaughter in the microbiological contamination of chicken carcasses, and the necessity of development and evaluation of alternative methods for *Salmonella* spp. detection.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é hoje o principal setor gerador de divisas para a economia Brasileira e responde por um em cada três reais gerados no país. É uma atividade próspera, segura e rentável. No ano de 2007, o Brasil produziu 9,3 mil toneladas de carne de frango, qualificando-o como o terceiro maior produtor mundial. Neste mesmo ano, as exportações do país superaram as norte-americanas e, atualmente, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango. Em 2008 a exportação desse produto gerou uma arrecadação em torno de US\$ 3 bilhões de dólares para o Brasil, sendo que cerca de US\$ 3 milhões foram provenientes do mercado interno. Complementando este panorama, o Brasil possui um grande mercado consumidor interno, composto por mais de 180 milhões de habitantes e que representa um consumo per capita anual de aproximadamente 35,8 kg.

Diante da importância econômica e social da carne de frango para o agronegócio nacional, é necessária a adoção de medidas rigorosas e eficientes de controle da qualidade microbiana da carne produzida, visando o abastecimento de um mercado cada vez mais exigente e competitivo. Atualmente, o sistema de “Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle” (APPCC) constitui um programa eficiente de controle de qualidade do processamento e do produto final.

O controle microbiano em abatedouros de aves é importante pela presença de várias etapas críticas ao longo da linha de processamento. O monitoramento destas etapas é realizado pela pesquisa de indicadores microbianos, e estes, em altas contagens, podem sugerir a presença de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp. Entretanto, para aferição adequada da contaminação durante o processamento, é necessária a verificação sistemática desses parâmetros de qualidade a fim de garantir a segurança sanitária do produto final. Para o êxito do sistema, é imprescindível o uso de técnicas de diagnóstico rápidas, econômicas e eficientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Controle de qualidade

Os produtos alimentícios de origem animal, em especial a carne de aves, são facilmente contaminados antes, durante e após o abate. Etapas como sangria, escaldamento e evisceração favorecem a colonização dos tecidos por microrganismos deteriorantes e patogênicos (JAY et al., 2005). Um dos atuais desafios da indústria de alimentos é ampliar a vida de prateleira destes produtos, que pode ser comprometida por algumas de suas características naturais de produtos cárneos: primeiro, os tecidos animais passam por constantes reações bioquímicas (enzimáticas), e segundo, pelo desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Os programas de controle de qualidade têm sido uma alternativa para contornar esse problema.

A aplicação de sistemas de controle de qualidade na indústria de alimentos é uma exigência oficial em diversos países, inclusive no Brasil, que além do APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (BRASIL, 1998a) também exige a adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 1997) e o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003c). Estes programas, associados a outros, como BPF, Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), APPCC ISO 9.000 e ISO 22.000 são os pilares do controle da qualidade em alimentos. BPF e PPHO funcionam como suporte para o programa APPCC, e têm requisitos importantes que devem ser seguidos para a implementação de novos programas. Os requisitos das BPF se baseiam na higiene do estabelecimento, higiene pessoal e higiene na produção (BRASIL, 1997), enquanto os princípios do PPHO são higienização das instalações, equipamentos e utensílios, controle da potabilidade da água, higiene e saúde dos manipuladores, manejo dos resíduos, manutenção preventiva e calibração de equipamentos, controle integrado de vetores e pragas urbanas, seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens e um programa de recolhimento de alimentos (BRASIL, 2003a).

Em complementação, programas mais direcionados estão em desenvolvimento, com objetivos específicos para garantir qualidade e segurança dos alimentos. O Programa de Redução de Patógenos é um deles, e visa o monitoramento microbiano de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus a fim de construir um sistema de informação sobre a contaminação desses produtos. Esse monitoramento é realizado por meio de análises laboratoriais contínuas dos produtos "in natura" provenientes de estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2003c, BRASIL, 2008b).

Microrganismos indicadores são utilizados para avaliar o nível de higiene durante o abate e processamento. Ainda, podem sugerir a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos avaliados, apesar de não representarem risco direto à saúde humana (SCOTT et al., 2001). Um grupo de microrganismos indicadores amplamente utilizado no controle de qualidade de alimentos é o dos coliformes, que pode ser facilmente detectado e usado como sugestivo da presença de microrganismos patogênicos de origem entérica, presentes no ambiente de processamento ou oriundos dos próprios animais e nos humanos. Dentro do grupo dos coliformes, existem família, gêneros e espécies que podem ser utilizadas como indicadores de problemas sanitários mais específicos, como a possível contaminação com matéria de origem fecal, sugerida pela presença de microrganismos da família Enterobacteriaceae, mais especificamente *Escherichia coli* (KORNACKI e JOHNSON, 2001). O indicador de contaminação fecal ideal deve ter a mesma taxa de multiplicação do patógeno, estar presente nas fezes em alto número, não ser patogênico, ser fácil e rapidamente detectável e ter correlação com a presença do patógeno, características que *E. coli* possui (GHAFIR et al., 2008).

Além dos coliformes, os aeróbios mesófilos também são freqüentemente utilizados como indicadores microbiológicos. Diferente dos coliformes, seu uso como indicador de segurança é limitado, ou seja, sua associação com patógenos não é bem estabelecida. Porém, são utilizados com freqüência no monitoramento de higiene sanitária para verificar o correto emprego das Boas Práticas de Fabricação por parte das indústrias, além de serem utilizados para monitoramento microbiológico na etapa de validação do sistema APPCC (MARTINS e GERMANO, 2007).

O sistema APPCC é reconhecido como o método mais eficiente de garantia de qualidade e segurança de alimentos, que permite identificar riscos específicos e medidas preventivas para seu controle (KVENBERG et al., 2000). O APPCC foi inicialmente desenvolvido pela Pillsbury Company como um meio de garantir a segurança dos alimentos produzidos para o Programa Espacial dos Estados Unidos. A National Aeronautic and Space Administration (NASA) precisava de um programa “defeito zero” para garantir a segurança dos alimentos que os astronautas iriam consumir no espaço. Assim, foi proposto o sistema APPCC à Conferência Nacional de Proteção dos Alimentos dos Estados Unidos em 1971, e desde então o programa tornou-se gradualmente reconhecido como um valioso método para o controle de qualidade em indústrias de alimentos (HULEBACK e SCHLOSSER, 2002).

O APPCC baseia-se numa análise sistemática para identificar os perigos, avaliar a probabilidade de acontecerem durante o processamento, a distribuição ou o uso do produto,

além de definir os métodos para controlá-los. Trata-se de um método baseado na aplicação de princípios técnicos e científicos de prevenção, que tem por finalidade, garantir a inocuidade dos processos de produção, manipulação, transporte, distribuição e consumo dos alimentos. Segundo o “Codex Alimentarius”, o sistema APPCC consiste em seguir os seguintes princípios: análise de perigos e medidas preventivas, identificação dos pontos críticos de controle (PCCs), estabelecimento dos limites críticos, procedimentos de monitoramento, ações corretivas, procedimentos de verificação, e por fim, estabelecimento dos procedimentos de registro (WHO, 1997; BRASIL, 1998a)).

Um PCC é definido como um ponto da linha de produção no qual um controle pode ser aplicado, sendo essencial prevenir ou eliminar um perigo crítico à segurança dos alimentos, reduzi-lo ou mantê-lo a um nível aceitável (WHO, 1997). O monitoramento tem o propósito de assegurar que as medidas de controle operem como planejado nos PCCs, e detectem qualquer perda de controle. Os métodos de controle devem ser rápidos para serem efetivos, sendo primordial a definição precisa do que deve ser monitorado, quando, como e quem será o responsável pela tarefa (WHO, 1997; BRASIL, 1998a).

A verificação é uma fase na qual tudo que foi realizado anteriormente passa por uma revisão de adequação para total segurança do processo. A verificação consiste na utilização de procedimentos complementares aos de monitoramento, que pode ser feita por meio de análises microbiológicas tradicionais de amostras obtidas ao longo do processamento. Apesar de demoradas, essas análises microbiológicas possuem respaldo da legislação. Nos relatórios de verificação devem constar todos os registros já efetuados, os de monitoramento, de desvios ocorridos, de ações corretivas e de treinamento de funcionários (WHO, 1997; BRASIL, 1998a).

Cada indústria de alimentos, inclusive as de processamento de aves, possui características específicas que determinam particularidades no sistema APPCC implementado. Características como estrutura do estabelecimento, equipamentos utilizados, mão-de-obra, processo de abate e origem da matéria-prima são fundamentais para o desenvolvimento de um sistema APPCC adequado, que auxiliarão na obtenção de produtos com qualidade e segurança. O ICMSF (1995) destaca possíveis PCCs no processamento de aves, que podem servir como suporte na implementação do APPCC em cada estabelecimento, tais como: origem da matéria-prima, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento. No Brasil, o abate de aves está regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de acordo com a Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 (BRASIL,

1998b). Nesta portaria estão destacadas as principais etapas do abate de aves com suas devidas regulamentações.

A origem das aves pode ser definida como um PCC, pois é a principal fonte de contaminação de *Salmonella* spp. para o abatedouro, sendo considerado como perigo a contaminação fecal cruzada por agentes patogênicos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Listeria* spp. e linhagens específicas de *E. coli* (RASSCHAERT et al., 2007). A entrada desses patógenos nos abatedouros pode ser controlada pela aquisição de animais livres dos mesmos, controle de pragas, destino adequado de aves mortas, garantia de qualidade de água e ração, além de controle efetivo de visitas de pessoas à granja sem as devidas medidas de biossegurança. Na expedição dos animais, devem ser utilizados caixas e caminhões devidamente higienizados e, por fim, respeitar o jejum estabelecido de 6 a 8 horas antes do abate (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

Na recepção dos animais, o perigo de contaminação por matéria fecal é devido ao jejum insuficiente e também, à contaminação cruzada. Nesta fase, a atenção deve se dirigir à fiscalização das condições de chegada dos animais, como número de animais por caixa, período de jejum, quantidade de aves mortas e condições sanitárias das aves (“status” sanitário, resíduos de antibióticos e coccidiostáticos) (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

Na insensibilização e sangria é difícil manter uma higiene individual devido à rapidez do processo de abate, o que facilita a disseminação de patógenos. O tempo mínimo exigido para uma sangria total é de até três minutos, assim, a possibilidade de multiplicação de microrganismos é minimizada. Durante todas essas etapas, os esterilizadores de facas devem ser calibrados de forma adequada e a temperatura atingida ser constantemente monitorada (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

A escaldagem também é considerada um PCC, pois há a possibilidade de disseminação de patógenos na água. As aves poderão ser escaldadas por pulverização de água quente e vapor, ou por imersão em tanque com água aquecida através de vapor; ou outro processo aprovado previamente pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). O sistema de controle da temperatura e a renovação contínua de água devem ser constantemente observados, de maneira que em cada turno de trabalho seja renovado o correspondente ao seu volume total, e que a temperatura da água esteja entre 60 e 62 °C (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

Outro PCC na linha de processamento de aves tem sido a depenagem, sendo considerada como perigo a possibilidade de contaminação cruzada pelos dedos de borracha. Idealmente, a depenagem deve ser mecanizada, executada com as aves suspensas pelos pés e

processadas logo após a escaldagem, sendo proibido o seu retardamento. Devem ser monitorados os dedos de borracha, fazendo o ajuste correto da máquina de depenagem e a higienização após o abate (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

A evisceração tem sido o PCC mais importante na linha de processamento de aves, pois o perigo em potencial é a contaminação da carcaça por matéria fecal e, conseqüentemente, microrganismos patogênicos entéricos. Pode haver ruptura das alças intestinais quando a evisceração é manual, provocada por erro operacional, ou também quando a evisceração é automatizada, devido à velocidade de abate ou ao mau funcionamento dos equipamentos. Portanto, vários fatores nessa etapa devem ser constantemente monitorados, como a execução da operação, o funcionamento dos equipamentos e a inspeção visual das carcaças para verificação de possível contaminação fecal. As medidas de controle consistem em treinamento adequado dos operadores, regularização da velocidade do abate de acordo com a capacidade operacional e a manutenção freqüente dos equipamentos utilizados (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

A lavagem tem como finalidade remover as sujidades aderidas superficialmente nas carcaças, e é freqüentemente realizada com jatos de água por chuveiros. O perigo reside na permanência dos microrganismos após essa lavagem, e devem ser monitorados sujidades e material fecal das aves, volume e pressão da água, teor de cloro, pressão e volume dos chuveiros (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

O pré-resfriamento e o resfriamento têm como finalidade conter a multiplicação dos microrganismos e reduzir a velocidade de reações químicas e enzimáticas. Esse procedimento pode ser feito por aspersão de água gelada, imersão em água por resfriadores contínuos (contracorrente) e resfriamento por ar (câmaras frigoríficas). O sistema mais utilizado nos abatedouros é do tipo imersão em água com cloro e gelo (chiller). Por sua vez, teores inadequados de cloro e temperatura elevadas nos tanques propiciam a multiplicação bacteriana e, portanto, a disseminação dos patógenos nas carcaças imersas no tanque. A facilidade de disseminação de microrganismos nessas etapas é o que as torna importantes PCC no processamento de aves. No resfriamento deve-se monitorar temperatura da água e tempo de permanência das carcaças nos tanques. No primeiro tanque a temperatura deve ser menor que 16 °C por 30 min e no segundo, menor que 4 °C por 30 a 40 min, ambos com concentração de cloro residual não superior a 5 mg/L residual. Após passagem pelos tanques, o excesso de água das carcaças deve ser drenado por gotejamento (a absorção não pode ser superior a 8% do peso da ave), fase na qual a temperatura das carcaças deve ser monitorada e

não deve ultrapassar os 4 °C nos miúdos, 7 °C nas carcaças refrigeradas ou 10 °C nas carcaças congeladas (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

Aves congeladas devem ser conservadas em câmaras frias a -18 °C, mantendo a temperatura no interior do músculo a -12 °C, enquanto as refrigeradas devem ser mantidas em câmaras frias entre -1 °C e 4 °C. A temperatura dos túneis de resfriamento e congelamento deve ser monitorada constantemente (ICMSF, 1995; BRASIL, 1998b).

No abate de aves é imprescindível o controle microbiano nas etapas consideradas importantes fontes de contaminação, principalmente de patógenos como *Salmonella* spp.

2.2. *Salmonella* spp.

2.2.1. Características gerais

O gênero *Salmonella* spp. foi inicialmente caracterizado em 1885, sendo sua denominação uma homenagem ao patologista que a descobriu, Daniel Salmon. Sua nomenclatura é complexa e controversa, sendo baseada principalmente em características dos antígenos somáticos (O, que define sorogrupos), flagelares (H, que definem sorotipos) e capsulares (K). Alguns sorotipos como *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Dublin apresentam o antígeno Vi (antígeno de virulência). Atualmente 2.463 sorotipos de *Salmonella* spp. são descritos, sendo suas fórmulas antigênicas definidas pelo “World Health Organization” (WHO) e pelo “Centre Recherche de *Salmonella* spp.” do Instituto Pasteur em Paris, França (BRENNER et al., 2000).

Nos anos 1970, análises moleculares demonstraram que todos os integrantes conhecidos do gênero *Salmonella* spp. possuíam entre 85 e 100% das características genéticas bastante correlacionadas entre si. Assim, em 1980 foi proposta a definição de apenas uma espécie, *S. cholerasuis*, designação previamente definida para um sorotipo específico. Em 1983, Le Minor e Popoff propuseram designar *S. enterica* como uma espécie única do gênero *Salmonella*, em substituição a *S. cholerasuis*. Desde então, essa nomenclatura vem sendo largamente utilizada em vários países e adotada por diversas organizações (BRENNER et al., 2000). Posteriormente, mais duas outras espécies foram sugeridas, *S. bongori* (REEVES et al., 1989) e *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004). Ainda, foi proposta a divisão da espécie *S. enterica* em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (HEYNDRICKX et al., 2005)

Considerando a divisão proposta, a denominação dos diferentes sorotipos deve ser realizada levando-se em consideração a fórmula antigênica (antígenos O, H e K) do microrganismo, ou pela determinação de um nome característico, usualmente adotado para diferenciar os sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*. Assim, convencionou-se denominar os diferentes sorotipos apenas pela descrição do gênero (*Salmonella*), seguido diretamente de sua denominação antigênica (fórmula ou nome característico) (POPOFF et al., 2000). *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, portanto, são sorotipos da subespécie *enterica*. Na espécie *S. enterica* é encontrada a grande parte de sorotipos causadores de salmonelose em mamíferos incluindo a espécie humana (BRASIL, 2008b).

Salmonella spp. também pode ser dividida de acordo com especificidade do hospedeiro e características clínicas da infecção. Portanto, podem-se considerar três categorias, sendo elas: *Salmonella* spp. altamente adaptadas ao homem (incluindo os sorotipos Typhi e Paratyphi A,B,C, agentes da febre tifóide e paratifóide, respectivamente), *Salmonella* spp. adaptadas aos animais como os sorotipos Dublin, Cholerasuis, Pullorum e Gallinarum e *Salmonella* spp. zoonóticas, que atingem indiscriminadamente tanto homens como animais, sendo responsáveis por gastroenterite e patógenos veiculados por alimentos como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Hadar* (LAX et al., 1995).

Esses microrganismos são bastonetes Gram - negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, produtores de ácido e gás a partir da glicose e ácido sulfídrico, com exceção da *S. Typhi* que não produz gás, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (5% das cepas são produtoras de gás). Geralmente são móveis, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. É um microrganismo pertencente à família Enterobacteriaceae, com pH de crescimento variando entre 4 e 9 com ótimo em 7, faixa de temperatura de crescimento está entre 7 °C e 47 °C com ótimo entre 35 °C e 37 °C, atividade de água mínima de 0,94, não tolerando concentrações de sal acima de 9%. A maioria dos sorotipos é produtora de gás, ácido sulfídrico, lisina e ornitina e descarboxilase positiva. *Salmonella* spp. ainda são urease e indol negativos e reduzem o nitrato a nitrito (JAY et al., 2005).

Esse patógeno pode ser encontrado no trato intestinal de mamíferos, aves, anfíbios e répteis. Alguns sorotipos de *Salmonella* spp. podem causar infecções com sintomas clínicos bem definidos. A dose infectante para humanos varia entre 10^5 a 10^8 células, porém, em pacientes imunocomprometidos têm sido observadas doses menores que 10^3 células para alguns sorotipos envolvidos em doenças de origem alimentar, o que depende de fatores particulares dos susceptíveis, tipo de alimento, fatores extrínsecos e intrínsecos (BRASIL, 2008b).

Salmonella spp. produz diversas sintomatologias como enterocolite, bacteremia, febre entérica e infecções focais. O sinal mais comum é a enterocolite, que é tipicamente caracterizada por dor abdominal, náusea, vômito, diarreia e dor de cabeça (PELZER, 1989). Os sinais típicos de enterocolite desenvolvem dentro de 12 a 36 horas após a ingestão do microrganismo. Em adultos saudáveis, a infecção normalmente é auto-limitante, resolvendo completamente dentro de uma semana. A patogenia de enterites por *Salmonella* spp. segue três fases: colonização, invasão do epitélio intestinal e a diarreia. Há evidências de que uma enterotoxina codificada pelo gene *stn* seja produzida por algumas cepas, provocando um aumento na produção de fluídos (CHOPRA et al., 1999). *S. Typhimurium*, particularmente o fagotipo DT 104, é o que mais acomete os humanos. Este fagotipo é reconhecido como um patógeno virulento e tem sido isolado com cada vez mais frequência (MOLBAK et al., 1999).

A maioria dos surtos de infecção alimentar em humanos tem sido associada ao consumo de ovos, alimentos preparados com ovos crus ou cozidos e carnes de frango contaminados com *Salmonella* spp. (POPPE, 1994). A contaminação cruzada é o principal fator de transmissão devido à elaboração ou preparo de carnes cruas que tiveram contato com alimentos crus, como no caso de superfícies contaminadas em cozinhas ou indústrias (PANISELLO et al., 2000). Historicamente, o sorotipo Typhimurium sempre foi o mais associado e prevalente em surtos e casos de infecção alimentar; entretanto, nos últimos 20 anos, o sorotipo Enteritidis tem sido o mais frequentemente isolado e associado a essas enfermidades.

Nos Estados Unidos da América (EUA) o número de casos de salmoneloses tem aumentando consistentemente desde a segunda guerra mundial. O Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2006) afirma que as doenças de origem alimentar podem estar aumentando, porém o número de mortes vem diminuindo. É relatado que *Salmonella* spp. não-tifoidal são responsáveis por 3.640 surtos e 1.412.498 casos. Nos EUA, *Salmonella* spp. é responsável por 26% de todas as infecções causadas por patógenos presentes em alimentos. Estima-se que 95% dos casos de salmonelose humana estão associados com o consumo de alimentos contaminados (MEAD et al., 1999). O custo econômico anual de infecções associadas à *Salmonella* spp. nos EUA tem sido estimado entre 2,3 milhões e 3,6 milhões de dólares. Este grande impacto econômico é devido à perda de trabalho, assistência médica e perda de vida associada à salmonelose (FRENZEN et al., 1999).

Um estudo realizado em São Paulo, Brasil, entre os anos 1996 e 2000 relatou os sorotipos de *Salmonella* spp. mais comuns em fontes não humanas. Dentre os 123 isolados identificados, *S. Enteritidis* foi o mais prevalente (32,7%), seguido de *S. Senftenberg* (10,3%),

S. Hadar (6,8%), *S. Agona* (5,1%), e *S. Typhimurium* (2,4%). No mesmo estudo, os gêneros alimentícios mais contaminados com *Salmonella* spp. foram a carne de frango (40%), carne bovina (11%), sobremesas (8%), maionese (6%), salsicha (5%) e casca de ovos não pasteurizados (4%), além de várias outras fontes de alimentação (26%) (TAVECHIO et al., 2002).

O conhecimento adequado do perfil epidemiológico de *Salmonella* spp. é fundamental para o controle efetivo de salmoneloses. Porém, esse perfil é influenciado por diversos fatores, como diferença entre hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento, o que dificulta sua completa compreensão. Poucos estados e municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os sorotipos causadores de salmoneloses de origem alimentar, além dos alimentos mais freqüentemente envolvidos e fatores intrínsecos e extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento do patógeno, o que dificulta o reconhecimento da emergência de novos sorotipos e seu controle efetivo (AMSON et al., 2006).

2.2.2. *Salmonella* spp. e indicadores em carne de frangos

A transmissão de *Salmonella* spp. em aves pode ser do tipo vertical ou horizontal. A transmissão horizontal envolve todos os tipos de sorotipos, e se dá através do meio ambiente, onde roedores são portadores assintomáticos disseminando assim, o patógeno por diversos anos. As rações também podem servir como fonte de infecção para as aves, porém, na literatura nacional, durante o século XX entre as décadas de 80 e 90, não havia sorotipos adaptados às aves registrados como contaminantes em rações ou matérias-primas de origem animal (BRASIL, 2008b). Mesmo assim, medidas têm sido adotadas por criadores a fim de minimizar os riscos como a adoção do Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 2006). Na transmissão vertical, os ovos podem ser contaminados com *Salmonella* spp. como resultado de uma infecção do oviduto da ave ou, como ocorre frequentemente, pela contaminação da casca com fezes no momento da postura (GUARD-PETTER, 2001).

As salmonelas potencialmente reconhecidas como patogênicas ao ser humano são encontradas no trato digestório de aves saudáveis, assumindo, portanto, o papel de disseminadoras do agente no meio ambiente por meio das fezes que contaminam outras aves (BRASIL, 2008b). As aves contaminadas podem carrear o agente nas penas e pés para o abatedouro e, portanto, disseminar o agente na planta de processamento, contaminando a carcaça e os equipamentos (RASSCHAERT et al., 2007). O Serviço de Inspeção e Segurança

Alimentar dos EUA demonstrou que apenas 3% a 4% das aves que entram num abatedouro são positivas para *Salmonella* spp., enquanto que 35% das carcaças ao final do processo de abate apresentam o patógeno (GREEN, 1987).

Num estudo realizado em Mauá, São Paulo, em 60 abatedouros com condições rudimentares de abate, FUZIHARA et al. (2000) analisaram a frequência de *Salmonella* spp. O patógeno foi detectado em 42% das carcaças, 71,4% em caixas d'água, 23,1% das amostras em facas e câmaras e 71,4% em congeladores e geladeiras. Segundo os autores, estes resultados indicam que *Salmonella* spp. possui alta capacidade de disseminação em abatedouros, sendo capaz de sobreviver mesmo em ambientes hostis, tais como geladeiras e congeladores. Nesse mesmo estudo, a frequência de *Salmonella* spp. variou ao longo dos seguintes pontos: tanques de resfriamento (90%), em caixas plásticas (84%), após a depenagem (83,3%), após a evisceração (66,7%), primeiro tanque de pré-resfriamento (83,3%), segundo tanque (66,7%), coxa (100%), peito (100%), pés e pescoço (66,7%), fígado (100%), coração e moela (100%).

Em outro estudo realizado no Brasil, região Sul, amostras de carcaças e cortes de frango, além de superfícies de utensílios e equipamentos, foram coletadas em vários pontos em um abatedouro de aves. *Salmonella* spp. foi isolada em 6% do total de amostras, sendo que os principais pontos de contaminação foram as gaiolas de transportes (16,7%), boxes (10%), água de escaldagem (16,7%), tanques de resfriamento (6,7%), carcaça antes da evisceração (6,7%), carcaça após resfriamento (3,3%), peito "in natura" (3,3%), coxa "in natura" (10%), asa congelada (13,3%), coxa congelada (13,3%), intestinos (6,7%), na pele do peito e das pernas (10%) e pele do pescoço (6,7%) (REITER et al., 2007).

Soares et al. (2002) realizaram um estudo em um abatedouro do Rio Grande do Sul, Brasil, para analisar PCCs no abate de aves pela pesquisa de diferentes indicadores microbiológicos. Coliformes e *E. coli* variaram ao longo dos principais pontos analisados, como gaiolas antes da desinfecção (3,2 e 3,3 log₁₀ NMP/cm², respectivamente), gaiolas depois da desinfecção (2,4 e 2,5 NMP/cm²), swab de facas de sangria (2,0 e 2,0 NMP/cm²), água de escaldagem (1,0 e 1,1 NMP/cm²), carcaça na depenagem (2,1 e 2,2 NMP/cm²), carcaça após evisceração (2,3 e 2,6 NMP/cm²), água do pré-chiller (2,4 e 2,3 NMP/cm²), água do chiller (2,1 e 2,1 NMP/cm²), carcaça no pré-chiller (2,1 e 2,1 NMP/cm²) e carcaça no chiller (1,7 e 1,8 NMP/cm²). Segundo os autores, as gaiolas apresentaram alta contaminação por ser um ambiente naturalmente contaminado. A etapa após a evisceração foi o ponto mais contaminado devido às falhas no procedimento de abate, e a passagem pelo chiller reduziu as contagens de indicadores.

Mikolajczyk e Radkowski (2002) pesquisaram *Salmonella* spp. em carcaças ao longo da linha de abate de frangos num abatedouro na Polônia em pontos importantes de contaminação. O patógeno foi isolado em 23,75% das amostras analisadas, sendo que os principais pontos de contaminação foram: após o atordoamento (6%), após a evisceração (24%), antes do chiller (52%) e após o chiller (13%).

Num estudo realizado na Bélgica entre os anos 2000 e 2003, *Salmonella* spp. foi isolada em 25,6 % dos frangos, sendo 22,3% nas carcaças das poedeiras, 13,0% em filés e 25,6% em embutidos (GHAFIR et al., 2008).

Um levantamento realizado no País de Gales no ano de 2003 em frangos frescos e congelados mostrou que 5,7% das carcaças estavam contaminadas com *Salmonella* spp., das quais 24 (4,4%) eram produtos frescos e 18 (9,4%) congelados (MELDRUM et al., 2005).

Vaidya et al. (2005) realizaram um estudo sobre indicadores microbiológicos no processamento de frango. As contagens médias de aeróbios mesófilos variaram ao longo dos principais pontos analisados: após pendura ($5,18 \log_{10}$ UFC/cm²), após a sangria (5,24 UFC/cm²), após a escaldagem, depenagem e lavagem (3,95 UFC/cm²), após a evisceração (5,29 UFC/cm²), após a lavagem (4,98 UFC/cm²) e após a refrigeração (4,22 UFC/cm²). A prevalência de *E. coli* foi de 14,57%, e *Salmonella* spp. não foi detectada. Segundo os autores, as etapas de sangria e a evisceração foram consideradas como pontos críticos de controle. As pernas apresentaram contaminação máxima e alta prevalência de organismos indicadores, considerado portanto, um local crítico para a contaminação.

2.3. Métodos de diagnóstico

O impacto econômico e o aumento de doenças de origem alimentar tem resultado em esforços para desenvolver métodos de detecção mais sensíveis na identificação de patógenos como *Salmonella* spp.

Vários aspectos devem ser considerados no diagnóstico de *Salmonella* spp. Rotineiramente, a pesquisa desse patógeno é realizada pela sua caracterização fenotípica, que se baseia em identificação de produtos de expressão de certos genes, como a resistência aos antibióticos, sorotipagem e fagotipagem (BRENNER et al., 2000).

Os métodos genotípicos, por outro lado, têm uma grande capacidade de diferenciar os sorotipos de *Salmonella* spp., mesmo entre as linhagens mais intimamente relacionadas. As técnicas estudadas atualmente se baseiam em métodos de digestão enzimática, reação da polimerase em cadeia (PCR) e métodos baseados em seqüência de ácido nucléico.

Para a escolha do método ideal, uma série de fatores importantes precisa ser avaliada, incluindo o poder discriminatório, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (FOLEY et al., 2007). Muitas técnicas têm sido estudadas quanto a sensibilidade, tempo de duração e custo da análise, como a PCR, ensaios imunoenzimáticos (VON RUCKERT et al., 2008; WALKER et al., 2001), separação imunomagnética (IMS), amplificação de bacteriófagos, entre outros.

Entretanto, os métodos convencionais de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos são ainda considerados como oficiais em diversos países (ISO, 2002; FDA, 2008), inclusive o Brasil (BRASIL, 2003b). Essas metodologias são extremamente demoradas e podem apresentar falhas, principalmente quando o patógeno está presente no alimento em baixas concentrações. Apesar de representarem alternativas mais rápidas, as metodologias mais modernas ainda requerem etapas de pré-enriquecimento e os resultados positivos devem ser confirmados pelo método convencional (AGARWAL et al., 2002).

2.3.1. Metodologias convencionais

A metodologia convencional de isolamento, juntamente com a separação imunomagnética, são os únicos métodos de detecção de *Salmonella* spp. atualmente reconhecidos pelos órgãos oficiais no Brasil (BRASIL, 2003b). A metodologia convencional inclui as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios de cultura seletivos, identificação bioquímica e a provas de soroaglutinação. Este método tem como objetivo a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos com microbiota competitiva, ou quando as células se encontram em número reduzido ou injuriadas pelos processos industriais, como o calor, congelamento, secagem, salga e cura (SOUSA et al., 2007).

Embora oficialmente recomendada, essa metodologia requer vários dias até que um resultado conclusivo seja atingido. Além disso, as propriedades fenotípicas pelas quais *Salmonella* spp. são identificadas podem não ser expressas, e quando são, podem ser de difícil interpretação, além das células poderem estar num estado viável não cultivável (VNC) e não serem detectadas (MALORNY et al., 2003). Outra questão importante é que alguns alimentos como carne de aves, leite e derivados, apresentam alta contaminação por diferentes tipos de microrganismos e por substâncias químicas que podem interferir no desenvolvimento do patógeno pesquisado, nas etapas de isolamento ou no próprio alimento (NERO et al., 2007).

2.3.2 Metodologia alternativa: Reação em Cadeia da Polimerase

Nos últimos anos, vários métodos alternativos para a detecção da *Salmonella* spp. nos alimentos foram desenvolvidos, incluindo ensaios imunológicos, hibridização do ácido nucléico e a PCR (CANDRIAN, 1995; LI et al., 2000; VON RUCKERT et al., 2008). O método PCR é aplicado com êxito para detectar vários patógenos, incluindo *Salmonella* spp. em alimentos (MANDRELL e WACHTEL, 1999). As vantagens desta técnica incluem maior sensibilidade e menor tempo requerido para processar amostras no laboratório, quando comparada ao método padrão de diagnóstico (LAMPEL et al., 2000).

A técnica da PCR é eficaz para soluções puras de ácidos nucléicos. Entretanto, a sensibilidade pode ser reduzida quando o alimento contém sais, lipídios, proteínas e outros microrganismos que não são o alvo da detecção (LANTZ et al., 2000). O uso do pré-enriquecimento antes da análise da PCR tem finalidades distintas, incluindo a diluição de substâncias inibidoras e células não viáveis, além de multiplicação do microrganismo-alvo (OLSEN, 2000; SHARMA e CARLSON, 2000). Considerando as características dessa metodologia, sugere-se que a pesquisa de patógenos por PCR diretamente das amostras coletadas seria inviável pela baixa concentração natural dos mesmos, comum em alimentos, e pelo baixo volume a ser testado laboratorialmente (CANDRIAN, 1995).

A análise direta de *Salmonella* spp. em alimentos por PCR, sem as etapas de pré-enriquecimento, representaria uma importante alternativa para obtenção de resultados de forma bastante rápida, fundamental para programas de controle de qualidade. Entretanto, as limitações apontadas por CANDRIAN (1995), OLSEN (2000), SHARMA e CARLSON (2000), podem comprometer a confiabilidade dos resultados. MYINT et al. (2006) chegaram à conclusões similares e não conseguiram identificar *Salmonella* spp. em amostras de frango sem pré-enriquecimento, considerando uma quantidade mínima de 100 células para detecção. Mesmo com as etapas de pré-enriquecimento, a análise direta do DNA de *Salmonella* spp. no próprio alimento poderia ser feita em menos de dois dias, indicando a praticidade da PCR como ferramenta no monitoramento de patógenos numa indústria de alimentos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; MAKKER, A.; GOEL, S.K. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, p.243-250, 2002.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139-1145, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 04/09/1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, 08/09/1997, Seção 1, p.19.697, 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, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 10 de 22/05/2003. Institui o Programa Genérico de Procedimentos - Padrão de Higiene Operacional - PPHO, a ser utilizado nos estabelecimentos de leite e derivados que funciona sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). **Diário Oficial da União**, 28/05/2003, Seção 1, p.4, 2003a.

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, 2003b.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 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, 2003c.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 17 de 07/04/2006. Aprova, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade Avícola, o Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle. **Diário Oficial da União**, 10/04/2006, Seção 1, p.6, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. URL: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 10/05/2008a.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas isoladas de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango - PREBAF, 2008b.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2465-2467, 2000.

CANDRIAN, U.R.S. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v.23, p.89-103, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Salmonella surveillance: annual summary, 2003**. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/bmd/phlisdata/salmonella.htm>, 2006.

CHOPRA, A. K.; HUANG, J. H.; XU, X. J.; BURDEN, K.; NIESEL, D. W.; ROSENBAUM, M. W.; POPOV, V. L.; PETERSON, J. W. Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of the organism. **Microbial Pathogenesis**, v.27, p.155-171, 1999.

FOLEY, S.L.; ZHAO, S.; WALKER, R.D. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, p.253-276, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. Food and Drug Association, Washington, DC. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Acessado em: 10/11/2008.

FRENZEN, P.; RIGGS, T.; BUZBY, J.; BREUER, T.; ROBERTS, T.; VOETSCH, D.; REDDY, S. Food net working Group. *Salmonella* cost estimate update using Food Net data. **Food Review**, v.22, p.10-15, 1999.

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

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal of Food Protection**, v.71, p.35-45, 2008.

GREEN, S.S. Results of a national survey: *Salmonella* in broilers and overflow chill tank water, 1982-1984, **United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service**, Washington, D.C. 20250. 1987.

GUARD-PETTER, J. Minireview the chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v.3, p.421-430, 2001.

HEYNDRIKX, M.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. **The Veterinary Journal**, v.170, p.275-277, 2005.

HULEBAK, K.L.; SCHLOSSER, W. HACCP history and conceptual overview. **Risk Analysis**, v.22, p.547-552, 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). HACCP in Microbiological safety and quality, microorganisms in foods. **Blackwell Science**, p.357, 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 6579. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - **Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.**, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2002.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7.ed. Springer, New York, 790p., 2005.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. **Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators**. In: DOWNES F. P.; ITO K. (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods (4th ed., p.69-82). Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

KVENBERG, J.; STOLFA, P.; STRINGFELLOW, D.; GARRETT, E. S. HACCP development and regulatory assessment in the United States of America. **Food Control**, v.11, p.387-401, 2000.

LAMPEL, K.A.; ORLANDI, L; KORNEGAY, P.A. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4539-4542, 2000.

LANTZ, P.G.; ABU AL-SOUD, A.; KNUTSSON, R.; HAHN-HÄGERDAL, B. RÅDSTRÖM, P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. **Biotechnology Annual Reviews**, v.5, p.87-130, 2000.

LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Current perspectives in salmonellosis. Review. **Brazilian Journal of Veterinary**, v.151, p.351-377, 1995.

LI, X.; BOUDJELLAB, N.; ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal Food Microbiology**, v.56, p.167-177, 2000.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.290-296, 2003.

MANDRELL, R.E.; WACHTEL, M.R. Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.273-278, 1999.

MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. Microbiological indicators for the assessment of performance in the “Hazard Analysis and Critical Control Points” (HACCP) system in meat lasagna production. **Food Control**, v.19, p.764-771, 2007.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESSE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.

MELDRUM, R.J.; TUCKER, D.; SMITH, R. M. M.; EDWARDS, C. Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of whole, raw poultry on retail sale in Wales in 2003. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1447-1449, 2005.

MIKOLAJCZYK, A.; RADKOWSKI, M. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1475-1479, 2002.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, 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**, v.23, p.599-604, 2006.

MOLBAK, K.; BAGGESEN D.L.; AARESTRUP, F.M.; EBBESEN, J.M.; ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A.M.; WEGENER, H.C. An

outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **New England Journal of Medicine**, v.4, p.1420-1425, 1999.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BARROS, A.F.; BELOTI, V.; FRANCO, B.D.G.M. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**, v.162, p.397-401, 2007.

OLSEN, J.E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, v.33, p.257-266, 2000.

PANISELLO, P.J.; ROONEY, R.; QUANTICK, P.C.; STANWELL-SMITH, R.; Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal Food Microbiology**, v.59, p.221-234, 2000.

PELZER, K.D. Salmonellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, p.456-463, 1989.

POPPE, C. *Salmonella* Enteritidis in Canadá. **International Journal Food Microbiology**, v.21, p.1-5, 1994.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J., BRENNER, F.W. Supplement 1998 (n° 42) to the Kauffmann – White scheme. **Research in Microbiology**, v.151, p.63-65, 2000.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; ZUTTER, L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, v.103 p.333-341, 2007.

REEVES, M.V.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as show by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.313-320, 1989.

REITER, M.G.R.; FIORESE, M.L.; MORETTO, G.; LOPEZ, M.C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1723-1725, 2007.

SCOTT, V.N.; ANDERSON, J.E.; WANG, G. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES F. P.; ITO K. (Eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** (4.ed, p.229-237). Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

SHARMA, V.K.; CARLSON, S.A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5472-5476, 2000.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and u(vi)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-ph, nitrate- and u(vi)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2959-2965, 2004.

SOARES, J.; BENNITEZ, L.B.; TERRA, N.N. Análise de pontos críticos no abate de frangos, através da utilização de indicadores microbiológicos. **Higiene Alimentar**, v.16, p.53-61, 2002.

SOUSA, M.F.P.; SOARES, C.O.; CARRIJO, A.S. *Salmonella* sp. em avicultura industrial: diagnóstico imunológico e molecular. **Higiene Alimentar**, v.21, p.53-58, 2007.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A. C. R.; PERESI, J.T. M.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1041-1044, 2002.

VAIDYA, V.M.; PATURKAR, A.M.; WASKAR, V.S.; ZENDE, R.J.; RAWOOL, D.B. Detection of indicator organisms on poultry carcass sites in an organized slaughterhouse. **Journal of Muscle Foods**, v.16, p.289-297, 2005.

VON RUCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; MORAES, M.P.; JUNIOR, A.S., NERO, L.A. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* spp. monitoring in chicken. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.16, p.185-195, 2008.

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**, v.67, p.123-129, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Annex to CAC/RCP 1-1969, Rev. 3. **Food hygiene basic text**, v.1b. Suppl. FAO/WHO, p.33-45, 1997.

OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram comparar dois abatedouros de aves com sistemas de abate distintos quanto a indicadores microbiológicos de higiene e *Salmonella* spp., e avaliar um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, a fim de fornecer dados científicos consistentes e ferramentas metodológicas a serem considerados na elaboração de programas de controle de qualidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Especificamente, a comparação entre os abatedouros foi realizada analisando-se microrganismos indicadores de higiene (aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*) e *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos em diferentes etapas do abate, a fim de se identificar diferenças entre processamentos e efeitos de cada etapa na contaminação por microrganismos.

Ainda, um protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. foi desenvolvido a partir das amostras superficiais, caldo de pré-enriquecimento não incubado e caldo de pré-enriquecimento após incubação, e comparado com a metodologia convencional de isolamento desse patógeno.

CAPITULO 1

***Salmonella* spp. e microrganismos indicadores de higiene em carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas de processamento em dois abatedouros.**

RESUMO

***Salmonella* spp. e microrganismos indicadores de higiene em carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas de processamento em dois abatedouros.** A carne de frango é considerada um importante veículo de agentes causadores de infecções alimentares, como a *Salmonella* spp., o que demanda um controle efetivo de sua contaminação nas diferentes etapas de processamento. Este estudo teve como objetivo analisar a presença de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores de higiene em diferentes etapas do processamento de frangos em dois abatedouros, Ab1, considerado como de grande porte, e Ab2, pequeno porte. Amostras superficiais de carcaças de frangos foram coletadas nas seguintes etapas: A) imediatamente antes da evisceração, B) após evisceração, C) após chuveiro de lavagem e D) após chiller. Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* spp., aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), coliformes termotolerantes (CTT) e *E. coli* (EC). As médias e freqüências obtidas foram comparadas por ANOVA e Qui-Quadrado ($P < 0,05$) considerando diferentes abatedouros e etapas do processamento. Não houve diferença significativa entre as freqüências de *Salmonella* spp. obtidas em diferentes etapas do abate em Ab1 ou Ab2 ($P > 0,05$). Verificou-se maior contaminação em Ab2 em relação a Ab1 por AM nas etapas B e D, CT e CTT na etapa D e EC em todas as etapas ($P < 0,05$). A variação da contaminação por microrganismos indicadores ao longo do processo de abate indicou a importância de diferentes procedimentos adotados pelos abatedouros na qualidade microbiana das carcaças de frangos.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., indicadores microbiológicos, APPCC, abate de frangos.

ABSTRACT

***Salmonella* spp. and hygiene indicators microorganisms in chicken carcasses obtained in different steps of processing in two slaughterhouses.** Chicken meat is considered as an important vehicle of foodborne pathogens, such as *Salmonella* spp., demanding an effective control of its contamination during the industrial processing. This study aimed to investigate the presence of *Salmonella* spp. and microbiological indicators at different steps of processing from two slaughterhouses (Ab1, large-scale, and Ab2, small-scale). Surface samples of chicken carcasses were collected in following sequential steps: A) immediately before evisceration, B) after evisceration, C) after showering and D) after chiller. All samples were submitted to detection of *Salmonella* spp. and enumeration of mesophilic aerobes (MA), total coliforms (TC), thermotolerant coliforms (TTC), *Escherichia coli* (EC). The obtained means and frequencies were compared by ANOVA and Chi-square ($P < 0.05$) considering different slaughterhouses and steps of processing. No significant differences were observed between the frequencies of *Salmonella* spp. obtained at different steps in Ab1 and Ab2 ($P > 0.05$). Ab2 showed higher levels of microbiological contamination when compared to Ab1 for MA (in B and D steps), TC and TTC (D step) and EC (all steps) ($P < 0.05$). The variation in levels of contamination from microbiological indicators through the processing indicated the significance of different procedures adopted by slaughterhouses in the microbiological quality of chicken carcasses.

Keywords: *Salmonella* spp., microbiological indicators, HACCP, chicken slaughtering.

1. INTRODUÇÃO

A produção de carne de aves no Brasil vem aumentando de forma significativa, tanto pela demanda do mercado interno como pelo crescimento das exportações que vem ocorrendo desde a década de 1990 (BRASIL, 2008). No primeiro semestre de 2008, as exportações de carne de frango foram de 1,8 milhão de toneladas, representando cerca de US\$ 3,4 bilhões, além de 3 milhões de toneladas destinadas ao mercado interno (ABEF, 2008).

Devido à grande exigência dos países importadores por produtos com melhor qualidade, incluindo aspectos higiênicos na obtenção de carcaças de aves, cada vez mais metodologias de controle sistemático são adotadas por frigoríficos. Uma forma efetiva de se realizar esse controle é pelo monitoramento de indicadores de higiene, como preconizado na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (ICMSF, 1988). Apesar de não representarem risco aos consumidores, os microrganismos indicadores de higiene são freqüentemente utilizados como sinalizadores de patógenos, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (SCOTT et al., 2001). Aeróbios mesófilos são freqüentemente usados como indicadores de higiene do processo de produção de carnes, assim como a presença de *E. coli* é considerada como sugestiva de contaminação fecal (GHAFIR et al., 2008). Outros indicadores como enterobactérias, podem sugerir a presença de patógenos específicos no ambiente de produção ou no produto final (MARTINS e GERMANO, 2007).

O controle da contaminação de patógenos nos alimentos é a principal forma de prevenção de toxinfecções alimentares. *Salmonella* spp. é considerado como um importante causador dessas enfermidades, sendo responsável por 10 a 15% dos casos de gastroenterites agudas em humanos e freqüentemente associados à carne de aves e ovos (JAY et al., 2005). A presença de *Salmonella* spp. em carcaças depende das condições às quais as aves foram expostas durante a produção até o final do abate, incluindo condições sanitárias nas propriedades rurais, transporte e processamento no abatedouro (FLUCKEY et al., 2003). No Brasil, existe uma grande variedade de frigoríficos e abatedouros de aves, com capacidades, volumes, procedimentos, equipamentos e utensílios distintos, variáveis que podem interferir diretamente na contaminação por *Salmonella* spp. e indicadores microbiológicos de higiene (DICKEL et al., 2005b).

Este trabalho teve como objetivo comparar dois abatedouros, com diferentes capacidades e características de processamento quanto à presença de *Salmonella* spp. e de indicadores microbiológicos de higiene em importantes etapas da linha de abate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras e diluições

Um abatedouro com capacidade de abate 4.000 aves/dia (Ab2) foi selecionado para coleta de amostras. Foram definidas quatro etapas seqüenciais, previamente consideradas como importantes fontes de contaminação (RODRIGUES et al., 2008): A) imediatamente antes da evisceração, B) após a evisceração, C) após o chuveiro, e D) após o tanque de resfriamento (chiller). Os resultados obtidos neste estudo foram analisados e comparados aos obtidos de amostras provenientes de um frigorífico de médio a grande porte localizado no estado de Minas Gerais, Brasil, com capacidade de abate de aproximadamente 165.000 aves/dia (Ab 1), objeto de estudo de RODRIGUES et al. (2008). Em cada etapa foram coletadas amostras superficiais de carcaças de frangos (Ab1: 27 amostras por ponto, e Ab2: 30), sendo que cada unidade amostral foi obtida por esfregaços de 50 cm² utilizados em dois locais diferentes na carcaça: no peito, próximo ao pescoço; e na região dorsal, adjacente à cloaca coletados com o auxílio de esponjas estéreis de poliuretano previamente embebidas em 10 mL de água peptonada (H₂Op) 0,1 % (ICMSF, 1986).

Após a coleta, as esponjas foram acondicionadas em sacos estéreis e homogeneizadas em “Stomacher” (400 circulador Seward, West Sussex, U.K.) por 1 min com 40 mL de H₂Op 0,1%, a fim de se obter homogenatos com um equivalente volumétrico da área amostrada (1 mL = 1 cm²). As amostras foram submetidas à diluição seriada em escala decimal a partir do homogenato inicial até 1:10.000.

2.2. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Uma alíquota de 25 mL do homogenato foi adicionada a 225 mL de H₂Op tamponada 1%, seguindo de incubação a 37 °C por 20 h (pré-enriquecimento). Em seguida, 1 mL foi semeado em caldo Selenito Cistina (SC) (incubação a 37 °C por 24 h) e 0,1 mL em caldo Rappaport Vassiliadis (RV) (42,5 °C por 24 h, em banho-maria) (enriquecimento seletivo). As culturas obtidas foram estriadas em ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) e em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com incubação a 37 °C por 24 h. Uma vez identificadas colônias típicas (BPLS: colônias incolores ou rosadas e XLD: colônias opacas, com ou sem produção de H₂S), as mesmas foram submetidas à identificação bioquímica preliminar em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), incubados a

37 °C por 24 h. A confirmação final foi realizada por testes sorológicos de aglutinação com anti-soros polivalentes somático (O) e flagelar (H) (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Foram consideradas como positivas, as amostras com reações bioquímicas características e com reações positivas nos dois testes sorológicos (BRASIL, 2003a).

Todas as culturas que apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos com antígenos polivalentes foram também submetidas à confirmação de pertencerem ao gênero *Salmonella* por PCR (OLIVEIRA et al., 2002) e sorotipagem pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). Todas as análises foram conduzidas em paralelo com *S. Enteritidis* ATCC 13076, como controle positivo e todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid (Oxoid Ltda., Basingstoke, UK).

2.3. Pesquisa de indicadores de higiene

As amostras coletadas foram submetidas à enumeração de microrganismos indicadores de higiene (Brasil, 2003a). Aeróbios mesófilos (AM) foram enumerados por plaqueamento direto em Ágar Padrão de Contagem (APC) (pour plate) e incubação a 35 °C por 48 h. As colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias/cm² (UFC/cm²).

Coliformes totais (CT) foram quantificados pela técnica dos tubos múltiplos em triplicata, utilizando o teste presuntivo em caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (35 °C por 24 a 48 h) e confirmados em caldo Verde Brilhante Bile 2% (BRILA) (35 °C por 24 a 48 h). Considerando o número de resultados positivos em cada triplicata, foi obtido um valor de número mais provável (NMP) e o resultado final foi expresso em NMP/cm². A partir dos resultados positivos de CT, Coliformes termotolerantes (CTT) foram pesquisados em caldo EC (44,5 °C por 24 h, em banho-maria), com resultados finais expressos em NMP/cm².

A partir dos resultados positivos para CTT, *E. coli* (EC) foi pesquisado de acordo com Kornacki e Johnson (2001). Alíquotas dos tubos de EC com resultado positivo foram estriadas em placas de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), e incubadas a 35 °C por 24 h. Quando presentes, colônias típicas de *E. coli* com aspecto metálico foram estriadas em PCA com incubação a 35 °C por 24 h e, em seguida, repicadas pontualmente em placas Petrifilm™ EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) previamente hidratadas com 1 mL de NaCl 0,85% e com incubação a 35 °C por 24 h, para verificação da atividade glucuronidásica (colônias azuis) e confirmação da espécie. Culturas ainda suspeitas foram identificadas bioquimicamente utilizando-se BACTRAY 1 e 2 (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.,

Pinhais, PR, Brasil). Todas as análises foram realizadas em paralelo com um controle positivo, que consistiu de uma cultura de *E. coli* isolada de leite mastítico. Os resultados finais foram expressos em NMP/cm².

2.4. Monitoramento de temperatura e concentrações de cloro no processamento

Durante algumas coletas de amostras em Ab2, foram realizadas mensurações das temperaturas de escaldagem, pré-chiller, chiller e carcaças utilizando termômetro digital por raios infravermelhos. A quantidade de cloro residual livre no pré-chiller e chiller foi verificada usando equipamento eletrônico digital (LaMotte 1200 Colorimeter, Chertertown, MD, USA) com amplitude de leitura de 0,00 a 5,0 mg/L.

2.5. Análise dos resultados

As freqüências de amostras positivas para *Salmonella* spp. em cada ponto e em cada abatedouro foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado ($P < 0,05$). As médias de AM, CT, CTT e EC foram comparadas por ANOVA em cada etapa do processamento e abatedouro ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e XLStat 2009.1.02 (Addinsoft, New York, NY, EUA). As temperaturas em diferentes etapas e carcaças e a concentração de cloro mensurados foram comparados com os valores estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1998b).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de nove amostras das 108 analisadas no Ab 1 estavam contaminadas com *Salmonella* spp. (8,3%), enquanto seis das 119 amostras provenientes do Ab 2 apresentaram-se contaminadas por este patógeno (5,0%) (Tabela 1). Embora cada abatedouro tenha apresentado freqüências distintas de *Salmonella* spp. nas etapas pesquisadas, não foram verificadas diferenças significativas entre essas freqüências considerando tanto etapas de processamento quanto abatedouros. (Tabela 1) Todos os isolados de *Salmonella* spp. obtidos de Ab2 foram confirmados pela PCR empregada (Figura 1) e sorotipados como *S. Enteritidis*.

Lopes et al. (2007), encontraram uma baixa freqüência de *Salmonella* spp. em abatedouro de aves, uma vez que em apenas 1,6% das carcaças de frangos analisadas foram

detectadas a presença do patógeno, uma antes da entrada e outra após a saída dos tanques de resfriamento.

Tabela 1. Freqüências de *Salmonella* spp. em diferentes etapas de processamento em abatedouro de grande (Ab1) e pequeno porte (Ab2).

Etapa*	Ab1**	Ab2	Teste
A	1/27	0/29	χ^2 : 1,09, gl: 1; P > 0,05
B	3/27	2/30	χ^2 : 0,35, gl: 1, P > 0,05
C	4/27	2/30	χ^2 : 1,00, gl: 1; P > 0,05
D	1/27	2/30	χ^2 : 0,25, gl: 1, P > 0,05
Teste	χ^2 : 3,27; gl: 3; P > 0,05	χ^2 : 2,03; gl: 3; P > 0,05	

*A: imediatamente antes da evisceração, B: após evisceração, C: após chuveiro, D: após tanque de resfriamento.

** Dados de RODRIGUES et al. (2008)

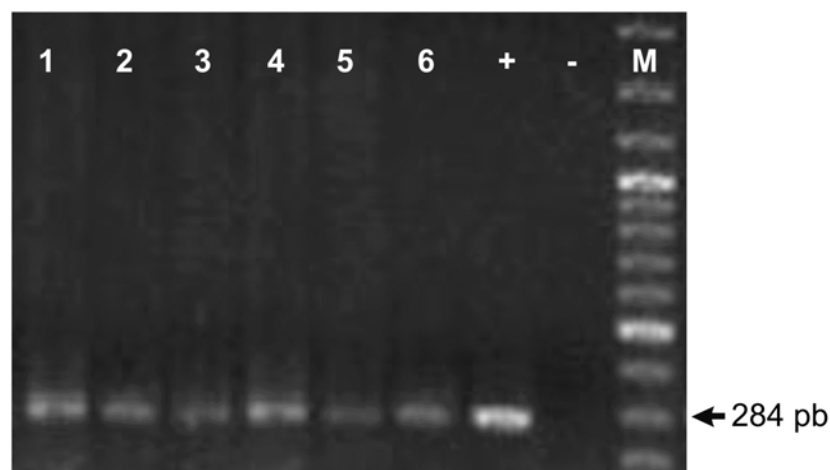


Figura 1. Gel de eletroforese com os produtos de amplificação obtidos pela Reação em Cadeia da Polimerase de seis culturas de *Salmonella* spp. (1 a 6) isoladas de amostras superficiais de carcaças de frangos obtidas em diferentes etapas de processamento de um abatedouro de pequeno porte (Ab2). Marcador molecular de 100-bp da Promega (Promega Co., Madison, WI, USA) (M); *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controle positivo (+) com um segmento de 284-pb; água Milli-Q como controle negativo (-).

Resultados diferentes foram encontrados por Dickel et al. (2005a), quando compararam a presença de *Salmonella* spp. em abatedouros com capacidades de abate diferentes: não houve isolamento de *Salmonella* spp. no abatedouro de menor porte, enquanto que no abatedouro de maior porte, 50% das amostras foram positivas, com oscilação ao longo do

processamento e predomínio de contaminação após a evisceração. Essa etapa, em especial, foi considerada como significante na contaminação por *Salmonella* spp. por ser realizada de forma mecanizada e facilitar a ruptura de alças intestinais de animais de tamanho não padronizado (DICKEL et al., 2005b). As frequências de *Salmonella* spp. em ambos os abatedouros atendeu às exigências do Programa de Redução de Patógenos, com valores inferiores a 23,5% (BRASIL, 2003b).

Os valores médios e a análise dos resultados da contaminação microbiana em cada etapa de processamento e de cada abatedouro amostrado são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias (\pm desvio padrão) dos valores de contaminação por aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* em quatro etapas do processamento de frangos no abatedouro de grande (Ab1) e pequeno (Ab2) porte.

Microrganismo Indicador	Etapa*	Abatedouro**	
		Ab1***	Ab2
Aeróbios mesófilos	A	4,07 \pm 0,50 ^{a, A}	4,41 \pm 0,47 ^{a, A}
	B	3,75 \pm 0,54 ^{b, A}	4,53 \pm 0,60 ^{a, A}
	C	3,65 \pm 0,38 ^{a, A}	3,90 \pm 0,45 ^{a, B}
	D	2,16 \pm 0,75 ^{b, B}	4,28 \pm 0,72 ^{a, A, B}
Coliformes totais	A	3,10 \pm 0,67 ^{a, A}	3,40 \pm 0,51 ^{a, A}
	B	3,28 \pm 0,50 ^{a, A}	3,36 \pm 0,44 ^{a, A}
	C	3,12 \pm 0,60 ^{a, A}	3,08 \pm 0,57 ^{a, A}
	D	1,52 \pm 0,46 ^{b, B}	2,49 \pm 0,51 ^{a, B}
Coliformes termotolerantes	A	2,94 \pm 0,65 ^{a, A}	3,40 \pm 0,50 ^{a, A}
	B	3,12 \pm 0,68 ^{a, A}	3,19 \pm 0,61 ^{a, A}
	C	2,92 \pm 0,60 ^{a, A}	3,03 \pm 0,59 ^{a, A}
	D	1,38 \pm 0,44 ^{b, B}	2,42 \pm 0,49 ^{a, B}
<i>E. coli</i>	A	1,71 \pm 0,76 ^{b, A}	3,35 \pm 0,50 ^{a, A}
	B	2,10 \pm 1,11 ^{b, A}	3,19 \pm 0,62 ^{a, A}
	C	1,57 \pm 0,45 ^{b, A}	3,01 \pm 0,58 ^{a, A}
	D	0,85 \pm 0,47 ^{b, A}	2,41 \pm 0,49 ^{a, B}

*A: imediatamente antes da evisceração, B: após evisceração, C: após chuveiro, D: após tanque de resfriamento.

**Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna ou minúsculas distintas na linha, por cada microrganismo indicador, diferem entre si por Análise de Variância ($P < 0,05$).

*** Segundo RODRIGUES et al. (2008).

Considerando os resultados obtidos, em Ab1 foi verificada redução significativa de AM, CT e CTT apenas entre as etapas C e D ($P < 0,05$), enquanto as médias de EC não apresentaram diferenças significativas nas etapas de processamento ($P > 0,05$). Em Ab2, AM

apresentaram redução significativa entre as etapas B e C, enquanto CT, CTT e EC entre as etapas C e D ($P < 0,05$). Esses resultados indicam a importância do chuveiro (C) no Ab 2 e do tanque de resfriamento (D) em ambos os abatedouros, na redução da contaminação de microrganismos indicadores de higiene. Esses resultados são similares aos observados por Gill et al. (2006), que sugerem que AM estão associados não apenas à pele da carcaça das aves, mas também a sujidades superficiais e pouco aderidas, sendo facilmente eliminadas por chuveiros como observado em Ab2 (Tabela 2). Falhas no ajuste da pressão de água desses chuveiros podem comprometer sua eficiência na redução da contaminação microbiana superficial (BOLDER, 1997), como foi observado em relação a AM em Ab1 (Tabela 2). Ainda entre essas etapas, não foi verificada redução significativa da contaminação por coliformes (CT, CTT e EC) em ambos os abatedouros, provavelmente pela maior capacidade de adesão desses microrganismos (GILL et al., 2006). Cason et al. (2004) afirmaram que muitos microrganismos se aderem fortemente a carcaças por ficarem alojados nas dobras da pele, não sendo removidas facilmente.

A passagem pelo tanque de resfriamento foi importante para promover redução significativa de CT e CTT em carcaças processadas em ambos os abatedouros, além de AM em Ab1 e EC em Ab2. Esse efeito de redução promovido por essa etapa já foi descrita por Allen et al. (2000), que realizaram um estudo sobre a eficiência dos tanques de resfriamento por imersão e constataram redução significativa da contaminação por coliformes em carcaças de frangos. Huezo et al. (2007), em estudo similar, observaram que, após a passagem pelos tanques de resfriamento, 90% da população de coliformes, principalmente de *E. coli*, é reduzida.

Na comparação entre os resultados obtidos nos dois abatedouros nas diferentes etapas de processamento, observa-se contagens maiores nas amostras coletadas em Ab2 por todos os microrganismos indicadores pesquisados na etapa D, após a passagem pelo tanque de resfriamento ($P < 0,05$) (Tabela 2). O tanque de resfriamento de Ab2 apresentou grande variação de temperatura (Figura 3), em desacordo com os padrões estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 1998b). As concentrações de cloro nos tanques de pré-resfriamento e resfriamento (Figura 2) também apresentaram grande variação, mas se mantiveram dentro do limite de 1 a 5 mg/L, recomendado pelo MAPA (BRASIL, 1998b) o que pode ter compensado parte do efeito negativo da temperatura sobre a contaminação das carcaças. Essas variações em Ab2 podem explicar a menor redução dos microrganismos indicadores na última etapa de processamento, uma vez que a água de tanques de resfriamento pode contribuir com a contaminação microbiana de carcaças de frangos (GILL et al., 2006). Em Ab1, as

mensurações de temperatura e cloro residual foram realizadas pelo Serviço de Inspeção Federal do abatedouro, e foram registradas dentro dos valores estabelecidos pelo MAPA (BRASIL, 1998b).

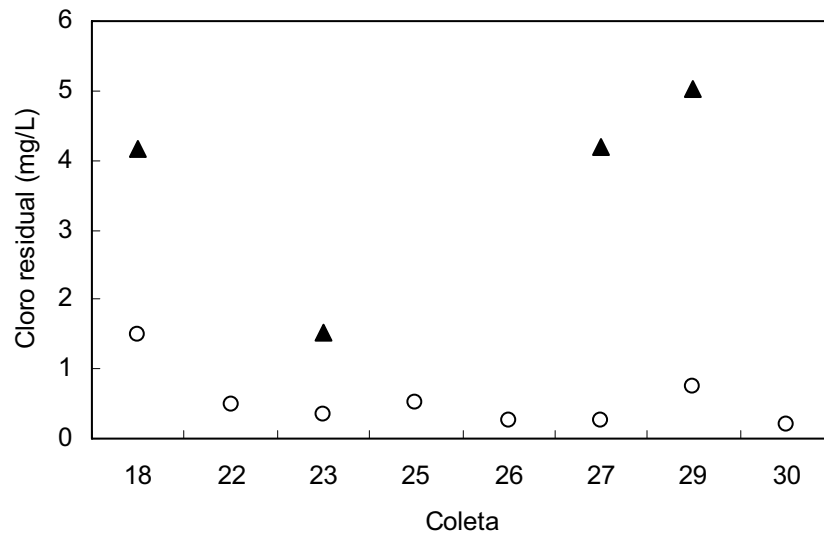


Figura 2. Variação da concentração de cloro residual livre em tanques de pré-resfriamento (pré-chiller, ▲) e do resfriamento (chiller, ○) obtidos no abatedouro de pequeno porte (Ab2).

Observou-se que as médias de AM foram significativamente maiores na etapa B, de evisceração, e de EC em todas as etapas ($P < 0,05$) (Tabela 2). A maior contaminação das carcaças após a evisceração no Ab2 deve-se a estrutura deficiente de abate deste estabelecimento. Por Ab2 ser um abatedouro de pequeno porte, as exigências quanto à higienização de equipamentos, ambiente e operadores no processo de abate, são menos rigorosas, além da operação ser realizada manualmente, o que pode ocasionar maior risco de contaminação pelo manuseio do operador ou por utensílios mal higienizados. Russel e Walker (1997) afirmaram que o aumento da contaminação por AM após a evisceração de carcaças de frangos é inevitável. Göksoy et al. (2004), entretanto, não verificaram interferência da evisceração na contaminação de AM no mesmo produto.

A relevância da pesquisa de EC em ambos os abatedouros foi diferente. Em Ab1, EC foi caracterizado em apenas 61% dos CTT (Tabela 2). Como afirmado por Voidarou et al. (2007), EC não pode ser usado como um clássico indicador em tanques de resfriamento uma vez que EC foi encontrado em apenas 30% dos CTT. Entretanto, EC estava presente em 99,5% dos CTT em Ab2, indicando que nesse caso esse grupo foi um bom indicador de higiene. Esses resultados sugerem que mesmo que a microbiota original fosse a mesma, houve, ao longo do

abate, mudanças no seu comportamento devido às diferentes tecnologias empregadas em cada abatedouro.

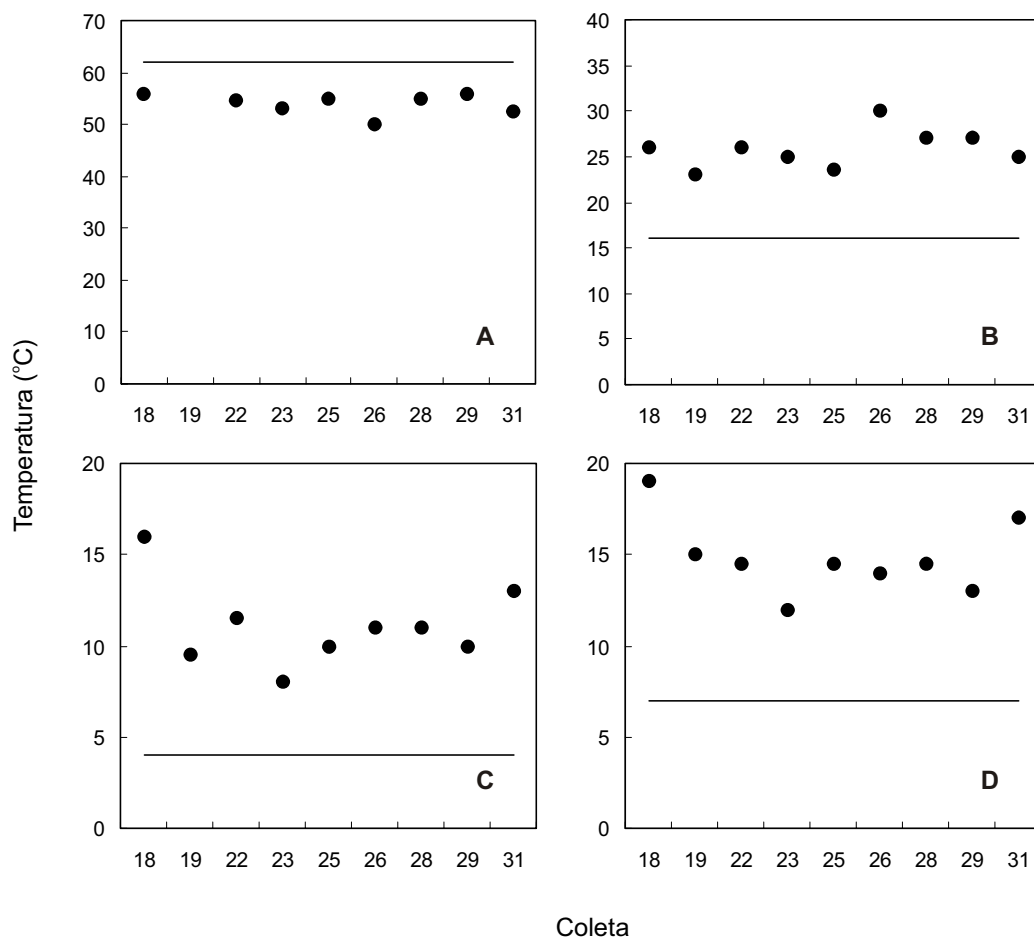


Figura 3. Variação de temperaturas mensuradas em diferentes etapas do processamento (A: escaldagem, B: pré-resfriamento e C: resfriamento) e interior de carcaças de frangos (D) durante coletas de amostras em abatedouro de pequeno porte (Ab2). Em cada gráfico, pontos indicam as temperaturas mensuradas e as linhas contínuas indicam os valores mínimos (em A) e máximos (em B, C e D) de referência (Brasil, 1998b).

Há poucos estudos a respeito das diferenças de contaminação em abatedouros de pequeno e grande porte. De uma forma geral, comparando os dois estabelecimentos, mesmo Ab2 sendo um estabelecimento de pequeno porte, onde o sistema de controle de qualidade ainda é inexistente, a contaminação ao longo das etapas de abate apresentou diferenças pontuais. Ab2 é um estabelecimento novo, com baixa velocidade de abate o que pode contribuir para o controle da contaminação no processo. Ab1, entretanto, possui um programa de APPCC consolidado, mas o grande volume de abate pode comprometer a execução adequada de procedimentos para o controle de qualidade. Resultados semelhantes foram

encontrados por Tsola et al. (2008), que analisaram o impacto da modernização nos principais pontos críticos de controle num abatedouro automatizado utilizando indicadores microbiológicos. Foi observado que após a modernização, houve uma redução significativa da contaminação microbiana ao longo da linha de abate, apesar de não ocorrer alteração dos principais Pontos Críticos de Controle destacados no APPCC.

Os resultados deste estudo mostraram que o uso de indicadores na identificação e monitoramento das principais etapas de contaminação microbiana no abate de aves pode ser valioso, permitindo também uma avaliação da eficiência do controle de qualidade estabelecida em cada abatedouro. Quanto ao patógeno estudado, concluiu-se que o tipo de abatedouro não interferiu nas frequências de *Salmonella* spp. encontradas. As variações nos níveis de contaminação em diferentes sistemas de abate reforçam os conceitos de APPCC enquanto planos específicos de implantação do sistema para produtos e processos diferentes inclusive no abate de frangos.

4. AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ernesto Hofer e Elaine Moura Falavina dos Reis, do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, pela realização da sorotipagem das culturas isoladas de *Salmonella* spp.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF, Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. **Estatísticas** URL: <http://www.abef.com.br/>. Acessado em 16/11/2008.

ALLEN, V.M.; CORRY, J.E.L.; BURTON, C.H.; WHYTEB, R.T.; MEAD, G.C. Hygiene aspects of modern poultry chilling. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.39-48, 2000.

BOLDER, N.M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.221-227, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 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, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 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 n° 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.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. URL: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 10/05/2008.

CASON, J.A.; BERRANG, M.E.; BUHR, R.J.; COX, N.A. Effect of prechill fecal contamination on numbers of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1829-1833, 2004.

DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F.M.; DUARTE, L.F.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V.P. 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, p.79-85, 2005a.

DICKEL, E. L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; VALLE, S.F.; CECHETTI, D.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V.P. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi-automatizada (médio porte) e semi-automatizada (pequeno porte). **Higiene Alimentar**, v.19, p.62-67, 2005b.

FLUCKEY, W.M.; SANCHEZ, M.X.; MCKEE, S.R.; SMITH, D.; PENDLETON, E.; BRASHEARS, M.M. Establishment of a microbiological profile for an air-chilling poultry operation in the United States. **Journal of Food Protection**, v.66, p.272-279, 2003.

GALHARDO, J.A.; LOPES, M.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; FREITAS, J.C.; MULLER, E.E. Eficácia dos tanques de pré-resfriamento na redução de contaminação bacteriana em carcaças de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p.647-656, 2006.

GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK K.L.; ZUTTER, D.G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. **Journal of Food Protection**, v.71, p.35-45, 2008.

GILL, C.O.; MOZA, L.F.; BADONI, M.; BARBUT, S. The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.187-193, 2006.

GÖKSOY, E. O.; KIRKAN, S.; KÖK, F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. **Poultry Science**, v.83, p.1427-1432, 2004.

HUEZO, R.; NORTHCUT, J.K.; SMITH, D.P.; FLETCHER, D.L.; INGRAM, K.D. Effect of dry air or immersion chilling on recovery of bacteria from broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1829-1834, 2007.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Microorganisms in Foods 2. **Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications**. Blackwell Scientific Publications, 1986.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality**. Blackwell Scientific Publications, 1988.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7.ed. Springer, New York, 790p., 2005.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. **Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators**. In: DOWNES F. P.; ITO K. (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods (4th ed., p.69-82). Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, S.R.; FABRE, S.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves / Research of *Salmonella* spp. and indicators microorganisms in poultry. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p.465-476, 2007.

MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. Microbiological indicators for the assessment of performance in the hazard analysis and critical control points (HACCP) system in meat lasagna production. **Food Control**, v.19, p.764-771, 2007.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.25-35, 2002.

RODRIGUES, A.C.A.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; PINTO, M.S.; NERO, L.A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, v.38, p.1948-1953, 2008.

RUSSELL, S.M.; WALKER, J.M. The effect of evisceration on visible contamination and the microbiological profile of fresh broiler chicken carcasses using the Nu-Tech evisceration system and the conventional streamlined inspection system. **Poultry Science**, v.76, p.780-784, 1997.

SCOTT, V.N.; ANDERSON, J.E.; WANG, G. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES F. P.; ITO K. (Eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods** (4.ed, p.229-237). Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

TSOLA, E.; DROSINO, E.H.; ZOIPOULOS, P. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. **Food Control**, v.19, p.423-431, 2008.

VOIDAROU, C.; VASSOS, D.; KEGOS, T.; KOUTSOTOLI, A.; TSIOTSIAS, A.; SKOUFOS, J.; TZORA, A.; MAIPA, V.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Aerobic and anaerobic microbiology of the immersion chilling procedure during poultry processing. **Poultry Science**, v.86, p.1218-1222, 2007.

CAPITULO 2

Avaliação de um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. diretamente de amostras superficiais de carcaças de frangos e de caldo de pré-enriquecimento.

RESUMO

Avaliação de um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp. diretamente de amostras superficiais de carcaças de frangos e de caldo de pré-enriquecimento. A carne de frango é um importante veículo de agentes causadores de infecções alimentares, como *Salmonella* spp., o que justifica um controle sistemático da contaminação microbiana durante o seu processamento industrial. Para isso, programas de qualidade são aplicados em abatedouros baseados em investigação microbiana de indicadores e patógenos, exigindo o desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e precisas. Este estudo teve como objetivo comparar a metodologia convencional (MC) de isolamento de *Salmonella* spp. com um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras superficiais de carcaças de frangos. O protocolo de PCR foi realizado diretamente das amostras coletadas (PCR-A), do caldo de pré-enriquecimento recém semeado (PCR-PE) e caldo de pré-enriquecimento após incubação (PCR-PEI). Os resultados obtidos foram comparados pelo teste Qui-Quadrado e McNemar ($P < 0,05$). Os valores de concordância, sensibilidade e especificidade das variações de PCR avaliadas foram calculados considerando a MC como parâmetro. Os resultados obtidos indicaram que apesar de serem observadas algumas similaridades entre as metodologias pelas frequências de resultados positivos ($P > 0,05$), a PCR-PEI apresentou diferenças significativas em relação às demais ($P < 0,05$), além de maior sensibilidade. Foram observadas grandes variações no desempenho da PCR no diagnóstico de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, que podem ser derivadas de fatores inerentes à obtenção desse alimento. Estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a aplicabilidade dessa metodologia como ferramenta de monitoramento microbiológico para sistemas de controle de qualidade em abate de frango.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., PCR, método convencional, abate de frangos.

ABSTRACT

Evaluation of a Polymerase Chain Reaction (PCR) procedure for *Salmonella* spp. detection directly from chicken carcasses surface samples and pre-enrichment broth.

Chicken meat is an important vehicle of foodborne pathogens, such as *Salmonella* spp., demanding a systematic control of the microbiological contamination during the industrial processing. This control occurs by the adoption of quality control systems in slaughters based on microbiological investigation of hygiene indicators and pathogens, requiring the development of fast, trustable and precise methodologies. The objective of this study was to compare the *Salmonella* spp. conventional methodology (CM) to a protocol of Polymerase Chain Reaction (PCR) in chicken carcasses surface sample. The PCR protocol was developed directly from the collected samples (PCR-S), from pre-enrichment broth before (PCR-PE) and after (PCR-PEI) incubation. The obtained results were compared by Chi-Square and McNemar tests ($P < 0.05$), and also the values of concordance, sensitivity and specificity of PCR variations were calculated considering the CM as parameter. The obtained results indicated some similarities between the methodologies when positive results were considered ($P > 0.05$), despite PCR-PEI presenting significant differences to all methodologies ($P < 0.05$) and higher sensitivity. It was observed wide variations in PCR performance for *Salmonella* spp. detection in chicken carcasses, which can be derivate of intrinsic factors of this food. Further studies are necessary in order to elucidate the applicability of PCR as a tool for microbiological monitoring in quality control systems for chicken processing.

Keywords: *Salmonella* spp. PCR, conventional method, chicken slaughtering.

1. INTRODUÇÃO

Salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais comuns do mundo. As aves são os principais reservatórios de *Salmonella* spp., cuja transmissão aos humanos frequentemente se dá através de produtos avícolas (OLIVEIRA et al., 2003). Isso determina a necessidade de implantação de programas de controle de qualidade em abatedouros, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), baseados em análises microbiológicas em diferentes etapas do processamento (ICMSF, 1988). Assim, há uma crescente demanda por metodologias aplicáveis na identificação de *Salmonella* spp. empregando testes rápidos de alto desempenho e internacionalmente aceitos (HALATSI et al., 2006).

Até o momento, a metodologia baseada em microbiologia convencional é universalmente reconhecida como o método padrão para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, que em teoria é capaz de detectar até uma célula viável presente na amostra (BUSSE, 1995). Entretanto, é uma metodologia laboriosa, que demanda preparo prévio de grande quantidade de material e meios de cultura, e requer entre cinco e sete dias para um resultado conclusivo.

Mais recentemente, métodos alternativos para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos tem sido avaliados, incluindo imunoensaios (WALKER et al., 2001; ALCOCER e OLIVEIRA, 2003; VON RUCKERT et al., 2008) e hibridização de ácidos nucleicos e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LI et al., 2000; CORTEZ et al., 2006; MYINT et al., 2006). As principais vantagens da PCR é a capacidade de detectar seqüências-alvo, independente da expressão de antígenos das células-alvo, além da maior sensibilidade e menor tempo para processar as amostras em laboratório, quando comparada às metodologias convencionais de isolamento do patógeno (BENNETT et al., 1998; RYCHLIK et al., 1999).

O objetivo desse estudo foi analisar o desempenho de um protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. diretamente de amostras de carcaça de frango e a partir do caldo de pré-enriquecimento antes e após a incubação, a fim de se verificar sua viabilidade como ferramenta em programas de controle de qualidade, como APPCC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e delineamento experimental

Esse estudo foi conduzido em um abatedouro com capacidade de processamento de 4.000 aves/dia em diferentes etapas do processamento (antes e após evisceração, e antes e após passagens por tanques de resfriamento) foram coletadas amostras superficiais de 120 carcaças de frangos, sendo que cada unidade amostral foi obtida por esfregaços de 50 cm², coletados com o auxílio de esponjas estéreis previamente embebidos em 10 mL de água peptonada (H₂Op) 0,1 %. Após a coleta, as esponjas foram acondicionadas em sacos estéreis e homogeneizadas em “Stomacher” (400 circulador Seward, West Sussex, U.K.) por 1 min com 40 mL de H₂Op 0,1%, a fim de se obterem homogenatos com um equivalente volumétrico da área amostrada (1 mL = 1 cm²).

Todas as amostras foram submetidas à metodologia convencional (MC) para detecção de *Salmonella* spp. Um protocolo de PCR foi utilizado para detecção do mesmo patógeno diretamente de todas as amostras (PCR-A), além dos caldos de pré-enriquecimento da MC antes (PCR-PE) e após (PCR-PEI) a fase de incubação a 37 °C por 20 h.

2.2 Microbiologia Convencional - *Salmonella* spp.

O pré-enriquecimento foi feito em uma alíquota de 25 mL do homogenato em 225 mL de Água peptonada tamponada 1%, com incubação a 37 °C por 20 h. Em seguida, 1 mL foi semeado em caldo Selenito Cistina (SC) seguindo-se de incubação a 37 °C por 24 h e 0,1 mL em caldo Rappaport Vassiliadis (RV) com incubação a 42,5 °C por 24 h, em banho-maria, constituindo o enriquecimento seletivo. As culturas obtidas foram estriadas em ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com incubação a 37 °C por 24 h. Uma vez identificadas colônias típicas (BPLS: colônias incolores ou rosadas e XLD: colônias opacas com ou sem produção de H₂S), as mesmas foram submetidas à identificação bioquímica preliminar em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), incubados a 37°C por 24h. A confirmação final foi realizada por testes sorológicos de aglutinação com anti-soros polivalentes somático (O) e flagelar (H) (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Consideraram-se como positivas, as amostras com reações bioquímicas características e com reações positivas nos dois testes sorológicos (BRASIL, 2003).

Todas as culturas que apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos com antígenos polivalentes foram também submetidas à confirmação do gênero por PCR (conforme descrito a seguir, e de acordo com GALAN et al., 1992, e OLIVEIRA et al., 2002) e sorotipagem pela Fundação Oswaldo Cruz. Todas as análises foram conduzidas em paralelo com *S. Enteritidis* ATCC 13076, como controle positivo e todos os meios de cultura utilizados foram da Oxoid (Oxoid Ltda., Basingstoke, UK).

2.3. Metodologia alternativa - Reação em Cadeia da Polimerase

Extração do DNA. O DNA presente nas amostras analisadas e nas culturas usadas como controle foi extraído pela técnica fenol-clorofórmio (OLIVEIRA et al., 2003). A extração de DNA seguiu as seguintes etapas: 1 mL do homogenato contendo a amostra superficial ou dos caldos de pré-enriquecimento antes e após incubação e culturas isoladas pela MC semeadas em água peptonada 1% e incubadas a 37 °C por 24 h foi centrifugado a 894 g por 4 min a temperatura ambiente; o centrifugado foi ressuscitado em 444 µL de TE (10 mmol/L tris-HCl pH 8 1 mmol/L de EDTA); 30 µL de lisozima (50 mg/mL) foi adicionado e incubado a 4 °C por 30 min; 25 µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10% e 1,25 µL de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados e incubados a 55 °C por 30 min; 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado e centrifugado por 4 min a 8.050 g em duas repetições, e então foi realizado uma lavagem final apenas com clorofórmio; o material obtido foi centrifugado novamente a 8.050 g por 4 min a temperatura ambiente; 35 µL de acetato de sódio (3 mol/L) e 350µL de isopropanol refrigerado foi adicionado e a mistura incubada a -20 °C por 30 min; o DNA foi centrifugado a 10.956 g por 10 min a 4 °C; o centrifugado foi lavado com 1 mL de etanol refrigerado a 80% e ressuscitado em 20 µL de água MilliQ autoclavada para uso imediato ou estocado a -20 °C.

Amplificação do DNA. A mistura para a reação da PCR foi preparada em água estéril MilliQ autoclavada, 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 1 U/µL Taq DNA polimerase. Aliquotas de 21 µL da mistura de reação foram colocadas 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). Os oligonucleotídeos foram projetados para detectar e amplificar um fragmento de DNA de 284 pb do gene *invA* de *Salmonella* spp. (Quadro 1, GALAN et al.,

1992). O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em um transluminador. Todos os reagentes utilizados foram da marca Phoneutria (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Todas as análises moleculares foram realizadas utilizando-se uma cultura de *S. Enteritidis* ATCC 13076 como controle positivo.

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para detecção de *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos e confirmação de isolados de *Salmonella* spp. obtidos pela metodologia convencional

Oligonucleotídeo	Gene alvo	Tamanho	Sequência (5' → 3')	Produto de Amplificação
139 (Forward)	<i>invA</i>	26	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3'	284 bp
141 (Reverse)	<i>invA</i>	22	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	284 bp

Fonte: GALAN et al., 1992.

Limite de detecção da PCR. Um produto de PCR do controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076) foi previamente clonado utilizando-se o kit Vector pGEM T Easy® (Promega Co., Madison, WI, USA), purificado utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e quantificado por espectrofotometria (DO₂₆₀). Este plasmídeo foi utilizado como DNA molde em testes de detecção, sendo diluído para as concentrações finais de 10¹⁰ a 10¹ cópias de plasmídeo PCV2/μL e utilizado como padrão para quantificação das amostras. O cálculo da massa do genoma foi realizado pelo software *ABI Prism 7500 User's Manual* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4. Análise dos resultados

As frequências de *Salmonella* spp. obtidas pela MC e pelas variações da PCR foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado, sendo as diferenças significativas identificadas pelo procedimento de Marascuilo (P < 0,05) utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e XLStat 2009.1.02 (Addinsoft, New York, NY, EUA). O teste McNemar foi utilizado para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos

(positivos e negativos) por todas as metodologias avaliadas ($P < 0,05$). As taxas de desempenho (sensibilidade, especificidade e concordância) das variações de PCR foram calculadas considerando a MC como referência, de acordo com as seguintes fórmulas (DOOHOO et al., 2003; MÄDE et al., 2004; GERMANO & GERMANO, 2008):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{NPS}}{\text{NP}} \times 100 \quad \text{Especificidade} = \frac{\text{NNS}}{\text{NN}} \times 100 \quad \text{Concordância} = \frac{\text{NPS} + \text{NNS}}{\text{NP} + \text{NN}} \times 100$$

Onde:

NPS: Número de resultados positivos simultaneamente na metodologia convencional (referência) e testada (variações de PCR);

NP: Número de resultados positivos na metodologia convencional (referência);

NNS: Número de resultados negativos simultaneamente na metodologia convencional (referência) e testada (variações de PCR);

NN: Número de resultados negativos na metodologia convencional (referência);

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As freqüências de resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos obtidas pela MC e pelas variações da PCR são apresentadas na Tabela 1. As reações de PCR positivas são ilustradas na Figura 1. Todas as culturas de *Salmonella* spp. isoladas pela metodologia convencional foram confirmadas pela PCR e identificadas sorologicamente como *S. Enteritidis*.

Tabela 1. Freqüências de resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos obtidos pela metodologia convencional de isolamento (MC) e um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase diretamente das amostras (PCR-A) e do caldo de pré-enriquecimento antes (PCR-PE) e após (PCR-PEI) incubação a 37 °C por 20 h.

Número de amostras	MC	PCR			Qui-Quadrado
		PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI	
Analisadas	119	120	120	120	
Resultados positivos*	6 ^{a,b}	0 ^a	2 ^a	16 ^b	26,61; gl = 3; P < 0,0001

* Letras distintas indicam diferença significativa pelo procedimento de Marascuilo ($P > 0,05$). gl: grau de liberdade.

Analisando os resultados da Tabela 1, observa-se a MC não diferiu estatisticamente de PCR-A, PCR-PE e PCR-PEI. Entre os procedimentos de PCR, houve diferença estatística entre PCR-A e PCR-PEI e entre PCR-PE e PCR-PEI. Entre PCR-A e PCR-PE não houve diferença estatística. Considerando apenas os resultados positivos, foram observadas similaridades entre as metodologias avaliadas, entretanto, considerando os resultados positivos e negativos, diferenças significativas foram identificadas (Tabela 2).

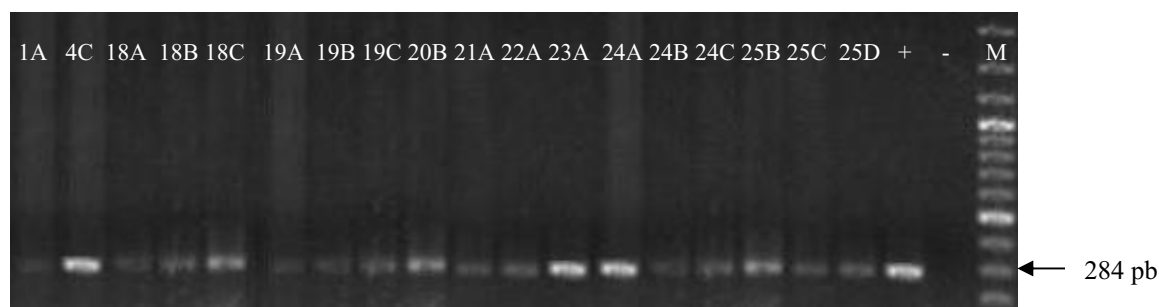


Figura 1. Gel de eletroforese com produtos de amplificação obtidos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de caldos de pré-enriquecimento sementeados com amostras superficiais de carcaças de frangos, antes (1A e 22A) e após (4C, 18A, 18B, 18C, 19A, 19B, 19C, 20B, 21A, 23A, 24A, 24B, 24C, 25B, 25C, 25D) incubação a 37 °C por 20 h. Marcador molecular de 100-bp da Promega (Promega Co., Madison, WI, USA) (M); *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controle positivo (+) com um segmento de 284-pb; água Milli-Q como controle negativo (-).

Tabela 2. Níveis de significância (P) obtidos pelo teste de McNemar para verificação de diferenças significativas entre metodologias de detecção de *Salmonella* spp. (Metodologia convencional, MC, e reação da cadeia de polimerase diretamente das amostras, PCR-A, e de caldos de enriquecimento antes, PCR-PE, e após, PCR-PEI, incubação a 37 °C por 20 h) em amostras superficiais de carcaças de frangos.

Metodologias	P*
MC x PCR-A	0,031
MC x PCR-PE	0,289
MC x PCR-PEI	0,031
PCR-A x PCR-PE	0,500
PCR-A x PCR-PEI	<0,0001
PCR-PE x PCR-PEI	0,001

* Valores inferiores a 0,05 indicam diferenças significativas entre as metodologias comparadas.

A MC apresentou diferença significativa apenas em relação ao PCR-A e PCR-PEI. Considerando as variações da PCR, diferenças significativas foram observadas entre PCR-PEI e PCR-A e entre PCR-PEI e PCR-PE (Tabela 2). Esses resultados indicam que a similaridade e equivalência entre as metodologias não devem ser avaliadas levando em consideração apenas os resultados positivos para *Salmonella* spp.

Outros parâmetros também devem ser considerados na avaliação de metodologias alternativas de isolamento de microrganismos, como sensibilidade, especificidade e concordância (DOOHOO et al., 2003). Considerando a MC como referência, os valores de sensibilidade, especificidade e concordância foram calculados e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras superficiais de carcaças de frangos por um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) diretamente das amostras (PCR-A) e de caldos de pré-enriquecimento antes (PCR-PE) e após (PCR-PEI) incubação a 37°C por 20h, considerando a metodologia convencional (MC) como referência para cálculo de taxas de desempenho.

Números de amostras	Metodologia alternativa		
	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
Testadas	119	119	119
Positivo pela MC	6	6	6
Positivo pela metodologia testada	0	2	16
Positivo pela MC exclusivamente	6	6	4
Positivo pela metodologia testada exclusivamente	0	2	14
Positivo pela MC e testada simultaneamente	0	0	2
Sensibilidade	0,0%	0,0%	33,3%
Especificidade	100,0%	98,2%	87,6%
Concordância	95,0%	93,3%	83,1%

Diversas técnicas de diagnóstico rápido vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos, sendo a PCR umas das mais promissoras. Vários autores relatam sua alta sensibilidade e especificidade (SOUMET et al., 1997; UYTTENDAELE et al., 2003; SHABARINATH et al., 2007), porém poucos estudos são realizados em amostras contaminadas naturalmente (OLIVEIRA et al., 2003). A PCR é usualmente empregada na análise de patógenos em alimentos a partir de amostras enriquecidas, após etapas de pré-enriquecimento da MC, quando teoricamente o microrganismo alvo atinge uma alta concentração, permitindo a

detecção de forma adequada (DICKINSON et al., 1995; MYINT et al., 2006). A PCR-PEI foi avaliada considerando essas observações, mas comparada com a MC, apresentou baixa sensibilidade (33,3%) (Tabela 3) e ausência de equivalência (Tabela 2), apesar de apresentar freqüências de resultados positivos estatisticamente similares (Tabela 1). Esses resultados podem ser explicados por fatores inerentes à amostragem em alimentos contaminados naturalmente. Gouws et al. (1998), afirmaram que a viabilidade dos microrganismos de amostras contaminadas artificialmente pode diferir das contaminadas naturalmente devido à diversidade da microbiota presente, o que pode interferir de forma significativa no desempenho da metodologia avaliada. Candrian (1995) afirmou que microrganismos cultivados naturalmente estão mais aderidos às partículas dos alimentos do que os microrganismos inoculados, interferindo na sua recuperação nos meios de enriquecimento.

Observando a Tabela 1 nota-se que não foi possível o isolamento de *Salmonella* spp. pela PCR-A. O pré-enriquecimento da amostra (PCR-PEI) propiciou uma maior sensibilidade no diagnóstico de *Salmonella* spp. (Tabela 3). A PCR a partir de amostras sem enriquecer, ou seja, diretamente do alimento, seria uma alternativa viável pela maior praticidade e rapidez. Essa metodologia é eficaz para soluções puras de ácidos nucléicos, sendo que a sua sensibilidade pode ser reduzida quando o alimento contém sais, lipídios, proteínas e outros microrganismos, diferentes do pesquisado (LANTZ et al., 2000), o que pode ter afetado o desempenho da PCR-A (Tabela 1). Resultados similares foram encontrados por Candrian (1995) e Myint et al. (2006), que não obtiveram êxito no isolamento de *Salmonella* spp. diretamente do alimento. Para contornar esse problema, uma variedade de tratamentos tem sido proposta para a extração do DNA, além de introdução de uma etapa de pré-enriquecimento na amostra (DICKINSON et al., 1995). Myint et al. (2006) afirmaram que o pré-enriquecimento traria mais segurança ao diagnóstico, já que reduziria a concentração de possíveis células não-viáveis, além de recuperar células estressadas, permitindo sua multiplicação e detecção.

Candrian (1995) e Salomonsson et al. (1999) afirmaram ser difícil a detecção de microrganismos pela PCR diretamente a partir de amostras de alimentos, porque além dos constituintes do alimento interferirem na PCR, o volume da amostra é relativamente pequeno. Ainda, a menor possibilidade de diagnosticar células “viáveis não-cultiváveis” (VNC) que poderiam estar presentes no homogenato também é uma desvantagem. Dickinson et al. (1995) realizaram PCR diretamente de amostras de alimentos e tiveram êxito no isolamento de *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, porém ressaltaram a importância de se obter DNA livre de resíduos para o funcionamento adequado da técnica de PCR. Agarwal et al. (2002)

conseguiram também detectar *Salmonella* spp. por PCR diretamente de alimentos, porém, artificialmente contaminados.

A sensibilidade da PCR depois do pré-enriquecimento foi de 33,3%, inferior ao encontrado por Myint et al. (2006), que determinaram uma sensibilidade de 80% no diagnóstico de *Salmonella* spp. a partir de amostras de frango contaminadas naturalmente e após o pré-enriquecimento. Quando as mesmas foram submetidas ao enriquecimento seletivo, a sensibilidade foi de 100%, indicando que para amostras contaminadas naturalmente é imprescindível essa etapa para um diagnóstico confiável.

Possivelmente, uma PCR mais sensível, como o Nested PCR, poderia ser eficaz em amostras sem a fase de pré-enriquecimento. Rychlik et al. (1999) realizaram Nested PCR em fezes contaminadas naturalmente e concluíram que, mesmo sem o pré-enriquecimento, o limite de detecção da técnica PCR foi de 10^5 UFC/g. Já Waage et al. (1999) não isolaram *Salmonella* spp. diretamente do alimento naturalmente contaminado mesmo com o Nested PCR.

A metodologia convencional é preconizada em muitos países como método oficial (ISO, 2002; FDA, 2008) de diagnóstico de *Salmonella* spp., inclusive no Brasil (BRASIL, 2003). Por esta razão é considerada como método de referência para avaliar o desempenho de novas técnicas de diagnóstico. Nesse contexto, observou-se que a PCR-PEI apresentou a maior sensibilidade e menor especificidade entre as demais metodologias analisadas, embora ainda apresentasse alta taxa de especificidade (87,6%).

O limite obtido de detecção do protocolo de PCR analisado foi de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL. Considerando esse limite, o protocolo de PCR analisado requer um valor muito alto de bactérias ($\geq 3,3 \times 10^7$ UFC/mL), o que geralmente só é atingido após enriquecimento da amostra. Resultados similares foram relatados por Oliveira et al. (2002), que encontraram uma grande variação no limite de detecção entre diversos sorotipos de *Salmonella* spp., sugerindo que particularidades da microbiota de cada alimento podem interferir substancialmente na PCR. Kim et al. (2007) encontraram um limite de detecção de 10^5 UFC/mL utilizando o mesmo gene alvo (*invA*), mas com oligonucleotídeos diferentes. Os limites de detecção de protocolos de PCR são usualmente realizados a partir de amostras experimentalmente contaminadas, o que pode subestimar a quantidade mínima do microrganismo alvo presente no alimento.

Contudo nota-se que 14 amostras foram identificadas pela PCR-PEI e não pela MC, sugerindo que a PCR-PEI apresenta maior sensibilidade, como já observado por Von Rückert et al. (2008). Essas 14 amostras não foram detectadas pela PCR-A possivelmente porque não

houve amplificação em quantidades suficientes para atingir a concentração mínima exigida pelo protocolo utilizado, além da presença de fatores interferentes. Muito se discute a respeito da sensibilidade da MC e sua validade como metodologia padrão. Neste aspecto, há vários fatores relevantes que afetam a sensibilidade da metodologia convencional. A microbiota competidora é o principal interferente, uma vez que ela pode gerar condições desfavoráveis para a sobrevivência e detecção do patógeno de interesse, como redução do pH e toxicidade do meio por liberação de metabólitos, além de resíduos químicos presentes no alimento, fatores que podem inibir o desenvolvimento da *Salmonella* spp. nas diferentes etapas de isolamento (D'AOUST et al., 1992; BUSSE, 1995). Esses fatores associados às específicas condições de injúria, como sanitizantes e variações de temperatura, podem determinar estresse nas células de *Salmonella* spp., prejudicando seu desenvolvimento e recuperação (NERO et al., 2007).

A seleção das seqüências que flanqueiam os segmentos de DNA que se pretende amplificar pela PCR é um ponto crítico da técnica. A especificidade da PCR decorre da precisão com que os iniciadores hibridizam com o DNA alvo. Para a detecção de *Salmonella* spp., a região escolhida deve ser comum à maioria das cepas, codificar para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros microrganismos (BAUNLER et al., 1997). O gene *invA*, utilizado neste estudo, codifica proteínas relacionadas à invasão e está presente na maioria das cepas de *Salmonella* spp., portanto, é o escolhido na maioria dos estudos (RAHN et al., 1992; WAAGE et al., 1999; SANTOS et al., 2001). Porém, Shabarinatah et al. (2007) comprovaram a baixa eficiência deste gene quando comparado ao gene *hns*. Ginocchio et al. (1997) afirmaram que o gene *invA* pertence a uma ilha de patogenicidade e, portanto, pode ser instável em alguns sorotipos de *Salmonella* spp. A PCR visando detecção de genes pertencentes a ilhas de patogenicidade pode gerar resultados falso negativos (SAROJ et al., 2008).

Kumar et al. (2008) realizaram um estudo comparando a sensibilidade da PCR e da MC em frutos do mar. Os outros autores mostraram que houve uma variação na sensibilidade da PCR entre os diferentes animais, que foi atribuída principalmente à natureza da amostra, uma vez que cefalópodes contém vários fatores inibitórios para a PCR. Oliveira et al. (2002) encontraram diferentes sensibilidades da PCR para detecção de um mesmo sorotipo de *Salmonella* spp., o que foi atribuído às condições diversas de amplificação ou às diferenças entre as linhagens do sorotipo em questão.

Possivelmente, as diferenças observadas entre as metodologias de isolamento de *Salmonella* spp. podem ser atribuídas à fatores intrínsecos entre os sorotipos e entre as

linhagens desse patógeno encontrados em cada estudo, gerando perfis distintos de PCR. Um delineamento prévio sobre a microbiota contaminante em cada estabelecimento poderia contornar esse problema. A PCR diretamente do alimento traria grandes vantagens frente à PCR de amostras pré-enriquecidas, como a possibilidade de diagnosticar células VNC, maior praticidade na execução das análises e menor tempo para obtenção de resultados finais. Entretanto, foram observadas várias deficiências dessa variação da PCR.

Apesar de apresentarem valores de concordância relativamente altos, as variações de PCR analisadas apresentaram deficiências que comprometerem seus desempenhos. As mesmas observações podem ser feitas em relação a MC. Dessa forma, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a aplicabilidade das variações de PCR analisadas como ferramentas de monitoramento de *Salmonella* spp. em abate de frango.

4. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; MAKKER, A.; GOEL, S.K. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, p.243-250, 2002.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n° 3, 2003.

BAUNLER, J.A.; HEFFRON, F.; REISSBRODT, R. Rapid detection of *Salmonella* enterica with primers specific for iroB. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1224-1230, 1997.

BENNETT, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.437-441, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 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, 2003.

BUSSE, M. Media for *Salmonella* **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p. 117-131, 1995.

CANDRIAN, U.R.S. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v.23, p.89-103, 1995.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; BURGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.340-344, 2006.

D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.M.; WARBURTON, D.W. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. **International Journal Food Microbiology**, v.16, p.41-50, 1992.

DICKINSON, J.H.; KROLL, R.G.; GRANT, K.A. The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.212-216, 1995.

DOOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiology Research**. AVC Inc., Charlottetown, Canada. p.86-113, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. Food and Drug Association, Washington, DC. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Acessado em: 10/11/2008.

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**, v.174, p.4338-4349, 1992.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. Manoele, São Paulo, 591p., 2008.

GINOCCHIO, C.C.; RAHN, K.; CLARKE, R.C.; GALÁN, J.E. Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v.65, p.1267-1272, 1997.

GOUWS, P.A.; VISSER, M.; BRÖZEL, V.S. A Polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1039-1042, 1998.

HALATSI, K.; OIKONOMOU, I.; LAMBIRI, M.; MANDILARA, G.; VATOPOULOS, A. KYRIACOU, A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. **FEMS Microbiology Letters**, v.259, p.201-207, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality**. Blackwell Scientific Publications, 1988.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 6579. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - **Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.**, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2002.

KIM, J.S.; LEE, G.G.; PARK, J.S.; JUNG, Y.H.; KWAK, H.S.; KIM, S.B.; NAM, Y.S.; KWON, S. A Novel Multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1656-1662, 2007.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P.K.; THAMPURAN, N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.221-226, 2008.

LANTZ, P.G.; ABU AL-SOUD, A.; KNUTSSON, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. **Biotechnology Annual Reviews**, v.5, p.87-130, 2000.

LI, X.; BOUDJELLAB, N.; ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.167-177, 2000.

MÄDE, D.; PETERSEN, R.; TRÜMPER, K.; STARK, R.; GROHMANN, L. Inhouse validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* spp. in food products. **European Food Research and Technology**, v.219, p.171-177, 2004.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, 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**, v.23, p.599-604, 2006.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BARROS, A.F.; BELOTI, V.; FRANCO, B.D.G.M. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional

methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**, v.162, p.397-401, 2007.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.25-35, 2002.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; CÉ, C.M.; ROCHA, S.L.S.; CANAL, C.W. Evaluation of seletive and non-seletive enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.217-221, 2003.

RAHN, K.; GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; MCEWE, S.A.; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C.L. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimuriun by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, p.271-279, 1992.

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 in Applied Microbiology**, v.29, p.269-272, 1999.

SALOMONSSON, A.; ASPÁN, A.; JOHANSSON, S.; HEINO, A.; HÄGGBLOM, P. *Salmonella* detection by polymerase chain reaction after pre-enrichment of feed samples. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.269-272, 1999.

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)**, v.29, p.87-92, 2001.

SAROJ, S.D.; SHASHIDHAR, R.; KARANI, M.; BANDEKAR, J.R. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture, Nested PCR combination assay. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.201-206, 2008.

SHABARINATH, S.; SANATH KUMAR, H.; KHUSHIRAMANI, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p.227-233, 2007.

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 in Applied Microbiology**, v.24, p.113-116, 1997.

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 in Applied Microbiology**, v.37, p.386-391, 2003.

VON RUCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; MORAES, M.P.; JUNIOR, A.S., NERO, L.A. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* spp. monitoring in chicken. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.16, p.185-195, 2008.

WAAGE, A.S.; VARDUND, T.; LUND, V.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.418-428, 1999.

CONCLUSÕES

Os resultados das contagens dos indicadores permitiram a identificação das principais etapas de contaminação e controle no processamento de frangos em sistemas de abate distintos. A procedência da matéria-prima e as etapas de resfriamento determinaram a variabilidade na contaminação entre os diferentes estabelecimentos, porém em ambos o resfriamento foi eficiente na redução dos indicadores. O tipo de abatedouro não influenciou na contaminação por *Salmonella* spp. Concluiu-se que há necessidade da implantação de programas de controle de qualidade específicos de acordo com as características de cada estabelecimento.

A frequência de resultados positivos de *Salmonella* spp. pela PCR foi similar à microbiologia convencional. Não foi possível identificar *Salmonella* spp. a partir de amostras não enriquecidas e o enriquecimento propiciou um aumento significativo na positividade de *Salmonella* spp. Há ainda variabilidade quanto ao desempenho da PCR e da MC e devido a isto, são necessários estudos complementares para avaliação de metodologias de diagnóstico confiáveis para monitoramento microbiológico na indústria de alimento.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de análises microbiológicas de amostras superficiais de carcaças de frangos coletadas em abatedouro de pequeno porte (Ab2).

Coleta	Etapa	AM	CT	CTT	EC	<i>Salmonella</i> spp.	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
1	A	4,04	4,04	4,04	4,04	-	-	+	-
1	B	4,66	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
1	C	3,88	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
1	D	3,45	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
2	A	3,84	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
2	B	4,59	3,38	2,36	2,32	-	-	-	-
2	C	3,23	2,58	2,58	2,58	-	-	-	-
2	D	3,08	1,96	2,56	2,56	-	-	-	-
3	A	4,04	3,18	3,18	3,18	-	-	-	-
3	B	4,59	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
3	C	3,40	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
3	D	3,64	1,96	1,96	1,96	-	-	-	-
4	A	4,43	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
4	B	4,46	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
4	C	3,79	3,38	3,38	3,38	-	-	-	+
4	D	4,51	1,79	1,79	1,79	-	-	-	-
5	A	5,41	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
5	B	5,53	4,04	3,66	3,66	-	-	-	-
5	C	5,08	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
5	D	5,71	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
6	A	5,04	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
6	B	5,11	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
6	C	4,43	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
6	D	3,43	2,18	2,18	2,18	-	-	-	-
7	A	3,92	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
7	B	4,4	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
7	C	3,71	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
7	D	5,15	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-

Continuação do Anexo 1.

Coleta	Etapa	AM	CT	CTT	EC	<i>Salmonella</i> spp.	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
8	A	3,73	4,04	3,32	2,97	+	-	-	-
8	B	4,15	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
8	C	3,79	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
8	D	4,56	3,32	4,04	4,04	-	-	-	-
9	A	4,11	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
9	B	3,58	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
9	C	3,38	3,38	3,18	3,18	-	-	-	-
9	D	4,08	1,96	1,96	1,96	-	-	-	-
10	A	3,89	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
10	B	3,52	2,63	2,63	2,63	-	-	-	-
10	C	3,4	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
10	D	2,86	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
11	A	3,83	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
11	B	3,58	2,97	2,63	2,63	-	-	-	-
11	C	3,2	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
11	D	3,87	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
12	A	4,45	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
12	B	3,93	2,97	3,38	3,38	-	-	-	-
12	C	4,04	3,46	3,46	2,97	-	-	-	-
12	D	4,04	2,3	2,58	2,58	-	-	-	-
13	A	5,08	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
13	B	4,04	2,63	2,63	2,63	-	-	-	-
13	C	3,99	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
13	D	3,4	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
14	A	5,48	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
14	B	5,53	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
14	C	3,67	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
14	D	3,62	2,15	1,48	1,48	-	-	-	-

Continuação do Anexo 1.

Coleta	Etapa	AM	CT	CTT	EC	<i>Salmonella</i> spp.	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
15	A	4,46	2,46	2,97	2,97	-	-	-	-
15	B	4,64	4,04	1,72	1,72	-	-	-	-
15	C	4,26	3,66	3,18	3,18	-	-	-	-
15	D	4,3	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
16	A	3,65	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
16	B	5,28	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
16	C	3,18	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
16	D	3,38	2,86	2,86	2,88	-	-	-	-
17	A	4,76	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
17	B	5,43	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
17	C	3,65	2,63	2,63	2,63	-	-	-	-
17	D	4,57	2,97	2,63	2,58	-	-	-	-
18	A	4,43	2,97	2,63	2,63	-	-	-	+
18	B	3,79	3,38	3,38	3,38	-	-	-	+
18	C	3,58	2,63	2,63	2,63	-	-	-	+
18	D	3,85	2,36	0,48	0,48	-	-	-	-
19	A	4,65	2,97	2,97	2,97	-	-	-	+
19	B	4,96	3,32	3,32	3,32	-	-	-	+
19	C	3,95	1,96	1,96	1,96	-	-	-	+
19	D	4,04	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
20	A	4,88	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
20	B	4,23	2,97	2,63	2,63	-	-	-	+
20	C	3,97	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
20	D	4,82	2,97	2,32	2,32	-	-	-	-
21	A	3,96	3,38	3,38	3,38	-	-	-	+
21	B	3,97	2,97	2,18	2,18	-	-	-	-
21	C	4,15	2,63	1,87	1,87	-	-	-	-
21	D	4,79	3,66	3,18	3,18	-	-	-	-

Continuação do Anexo 1.

Coleta	Etapa	AM	CT	CTT	EC	<i>Salmonella</i> spp.	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
22	A	4,26	4,04	4,04	4,04	-	-	+	-
22	B	4,20	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
22	C	3,89	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
22	D	5,38	2,63	2,63	2,63	-	-	-	-
23	A	4,4	4,04	4,04	3,32	-	-	-	+
23	B	4,43	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
23	C	4,23	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
23	D	4,3	2,18	1,96	1,96	-	-	-	-
24	A	4,6	2,97	2,97	2,63	+	-	-	+
24	B	4,85	3,66	3,66	3,66	-	-	-	+
24	C	4,11	3,66	3,66	3,66	+	-	-	+
24	D	4,6	2,36	2,36	2,36	-	-	-	-
25	A	5,2	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
25	B	4,78	3,38	3,38	3,38	-	-	-	+
25	C	4,81	3,66	3,66	3,66	-	-	-	+
25	D	4,73	2,63	2,63	2,63	-	-	-	+
26	A	5,04	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
26	B	5,08	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
26	C	3,99	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
26	D	5,45	4,04	3,18	3,18	-	-	-	-
27	A	4,78	2,18	2,18	2,18	-	-	-	-
27	B	4,75	2,86	2,86	2,86	+	-	-	-
27	C	4,2	1,96	1,96	1,96	-	-	-	-
27	D	4,72	2,63	2,18	2,18	+	-	-	-
28	A	4,61	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
28	B	5,41	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
28	C	4,36	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
28	D	4,6	2,18	2,56	2,56	-	-	-	-

Continuação do Anexo 1.

Coleta	Etapa	AM	CT	CTT	EC	<i>Salmonella</i> spp.	PCR-A	PCR-PE	PCR-PEI
29	A	4,28	3,66	3,66	3,66	-	-	-	-
29	B	3,77	3,38	3,38	3,38	-	-	-	-
29	C	3,66	2,63	2,63	2,63	-	-	-	-
29	D	4,45	2,36	1,96	1,96	+	-	-	-
30	A	4,4	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
30	B	4,94	4,04	4,04	4,04	-	-	-	-
30	C	4,11	2,97	2,97	2,97	-	-	-	-
30	D	4,92	2,18	2,18	2,18	-	-	-	-

No anexo 1:

Etapa: A: imediatamente antes da evisceração, B: após evisceração, C: após chuveiro, D: após tanques de resfriamento (chiller)

8 AM: Aeróbios mesófilos (log UFC/cm²), CT: Coliformes totais (log NMP/cm²), CTT: Coliformes termotolerantes (log NMP/cm²), EC: *Escherichia coli*, (log NMP/cm²), *Salmonella* spp: detecção por metodologia convencional, +: resultados positivos, -: resultados negativos, #: amostras descartadas.

No anexo 2:

PCR-A: Reação em Cadeia da Polimerase diretamente das amostras, PCR-PE: Reação em Cadeia da Polimerase do caldo de pré-enriquecimento antes da incubação, PCR-PEI Reação em Cadeia da Polimerase após incubação a 37°C por 20h.

Anexo 2. Concentrações de cloro livre residual em conteúdo de tanques de resfriamento avaliados em abatedouro de aves de pequeno porte (Ab2).

Coleta	Cloro livre residual (mg/L)	
	Pré-chiller	Chiller
18	4,17	1,49
22	#	0,49
23	1,52	0,34
25	#	0,52
26	#	0,26
27	4,18	0,25
29	5,02	0,74
30	#	0,19

#: parâmetro não mensurado.

Anexo 3. Temperaturas (°C) em diferentes etapas do processamento de carcaças de frangos em abatedouro de aves de pequeno porte (Ab2).

Coleta	Tanque de escaldagem	Pré - chiller	Chiller	Interior da carcaça
18	56	26	16	19
19	#	23	9,5	15
22	54,5	26	11,5	14,5
23	53	25	8	12
25	55	23,5	10	14,5
26	50	30	11	14
28	55	27	11	14,5
29	56	27	10	13
31	52,5	25	13	17

#: parâmetro não mensurado.